

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**O TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO COMO FATOR DE  
PREDISPOSIÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON: EVIDÊNCIAS  
OBTIDAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL**

**PAULO ALEXANDRE DE OLIVEIRA**

**Florianópolis  
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**O TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO COMO FATOR DE  
PREDISPOSIÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON: EVIDÊNCIAS  
OBTIDAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL**

**PAULO ALEXANDRE DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger  
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller

Florianópolis  
2012

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Rui Daniel S. Prediger, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, de realizar este trabalho sob sua dedicada orientação, pela amizade, e por acreditar em mim durante seu período de ausência. Ao professor Fernando Spiller, por aceitar ser meu co-orientador e por ter depositado em mim a sua confiança.

Aos professores doutores Geanne Matos de Andrade e Reinaldo Naoto Takahashi e ao doutor Aderbal Silva Aguiar Jr., pela valiosa contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos colegas do laboratório, Aderbal, Daniel, Eduardo, Filipe, Juliana, Sandro e Vanessa, pela amizade durante estes anos.

Ao professor doutor Roger Walz, por ter cedido o aparato para indução do TCE e ao seu doutorando Marcelo Liborio Schwarzbold que me ensinou a técnica do TCE.

À professora doutora Alexandra S. Latina e sua doutoranda Karina Ghisoni de Oliveira, do Departamento de Bioquímica da UFSC, pelos experimentos de dosagem de monoaminas com HPLC, embora estes não estejam incluídos neste trabalho.

À todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amados pais, Rosa e Felipe, e ao meu irmão Joce, pelo apoio incondicional e pelo incentivo em todas as etapas que passei.

À minha amada, Ana, pelo apoio, ajuda e companheirismo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E acima de tudo, a Deus, pelas oportunidades e vitórias conquistadas.

***“Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente.  
Mas o que melhor se adapta às mudanças”.***  
Charles Darwin

## RESUMO

A doença de parkinson (DP) é caracterizada por um processo neurodegenerativo lento e progressivo que acomete principalmente os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc). A causa primária da DP ainda não é conhecida, embora um crescente número de fatores genéticos e ambientais tenham sido propostos nos últimos anos, incluindo o trauma cranioencefálico (TCE). No presente estudo, nós investigamos se o TCE poderia representar um fator de predisposição às alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas com a DP em camundongos submetidos ao modelo experimental da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Os camundongos foram submetidos a um TCE moderado por meio de um aparato de queda livre de peso (12,5 g), sendo a gravidade do TCE confirmada através do escore neurológico de severidade (ENS). Cinco horas após a indução do TCE, alguns camundongos foram sacrificados para a análise da permeabilidade da BHE, enquanto outros receberam a administração intraperitoneal (i.p.) de salina ou 6-OHDA (100 mg/kg). Durante um período de 4 semanas, esses animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, incluindo o campo aberto, o rotarod, a catalepsia induzida por haloperidol, e os comportamentos de rotação e escalada induzidos por apomorfina. Finalizados os testes comportamentais, os animais foram sacrificados para a medida da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado através da técnica de imunodeteção de proteínas. O TCE moderado aumentou a permeabilidade da BHE, sendo que na quarta semana após a indução do TCE foi observado um prejuízo significativo no desempenho dos animais do grupo TCE + 6-OHDA nos testes do campo aberto, rotarod e ENS. De maneira importante, estes prejuízos foram revertidos pela administração aguda de L-Dopa (25 mg/kg, i.p.). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos testes da catalepsia induzida por haloperidol e na rotação induzida por apomorfina. Entretanto, foi observada uma redução no comportamento de escalada induzida por apomorfina, assim como uma diminuição na expressão de TH no estriado no grupo TCE + 6-OHDA. Em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam que a indução de um TCE moderado aumentou a permeabilidade da BHE, levando a uma maior susceptibilidade às alterações motoras e neuroquímicas induzidas pela 6-OHDA em camundongos. Portanto, os achados deste estudo corroboram

com dados epidemiológicos que indicam que o TCE pode representar um fator relevante de predisposição à DP, e sugerem que uma maior atenção deva ser dada para o risco em longo prazo para o desenvolvimento da DP após o TCE.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, traumatismo cranioencefálico (TCE), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), prejuízos motores, expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH), camundongos.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by a slow and progressive neurodegenerative process, particularly of the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). The primary cause of DP remains unknown, although an increasing number of genetic and environmental factors have been proposed, including the traumatic brain injury (TBI). In the present study, we have investigated whether TBI may represent a predisposing factor to PD-related alterations in mice submitted to the experimental model of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a neurotoxin unable to cross the blood-brain barrier (BBB). Mice were submitted to a moderate TBI by free weight-drop device (12.5 g) which was confirmed 1 h later through a neurological severity score (NSS) evaluation. Then, 5 h after TBI induction some mice were sacrificed for the analyses of BBB permeability, while others were injected intraperitoneally (i.p.) with saline or 6-OHDA (100 mg/kg). During a period of 4 weeks these animals were submitted to a battery of behavioral tests including the open field, rotarod, haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced rotation and climbing behavior for the evaluation of motor performance and then they were sacrificed for the analysis of striatal tyrosine hydroxylase (TH) expression through western blot. The current moderate TBI increased BBB permeability of adult mice. On the 4<sup>th</sup> week after TBI induction, significant motor and neurological impairments in the open field, rota-rod and NSS tests were observed in the animals from the TBI plus 6-OHDA group, which were reversed by the acute L-Dopa administration (25 mg/kg, i.p.). No changes were observed in the haloperidol-induced catalepsy and the apomorphine-induced rotation tests. Remarkably, pronounced reductions in the apomorphine-induced climbing behavior and striatal TH expression were observed selectively in the TBI plus 6-OHDA group. Altogether, the current findings indicate that a previous moderate TBI event can disrupt the BBB, increasing the susceptibility to motor, neurological and neurochemical alterations induced by dopaminergic neurotoxins such 6-OHDA in mice. Therefore, our results corroborate previous epidemiological studies indicating that TBI may represent a relevant predisposing factor for PD, and suggest that a greater attention should be given to the long-term risk of PD following TBI.

**Keywords: Parkinson's disease, traumatic brain injury (TBI), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), motor impairments, tyrosine hydroxylase (TH) expression, mice.**



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Ilustração dos sintomas motores e não-motores da doença de Parkinson.....	16
<b>Figura 2.</b> Ilustração esquemática dos gânglios basais .....	18
<b>Figura 3.</b> Ilustração das principais características neuropatológicas da doença de Parkinson .....	19
<b>Figura 4.</b> Eventos fisiopatológicos associados ao traumatismo cranioencefálico .....	26
<b>Figura 5.</b> Ilustração esquemática da unidade neovascular da barreira hematoencefálica .....	27
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela toxina 6-hidroxidopamina .....	30
<b>Figura 7.</b> Ilustração do aparato utilizado para a indução do traumatismo cranioencefálico experimental e representação do local do impacto .....	33
<b>Figura 8.</b> Esquema dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.....	35
<b>Figura 9.</b> Aparato utilizado para avaliação do Escore Neurológico de Severidade .....	36
<b>Figura 10.</b> Efeito do traumatismo cranioencefálico (TCE) sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica .....	43
<b>Figura 11.</b> Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA sobre o escore neurológico de severidade.....	44
<b>Figura 12.</b> Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA sobre a atividade locomotora de camundongos avaliada no teste do campo aberto.....	45

<b>Figura 13.</b> Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA sobre a coordenação motora de camundongos avaliada no teste do rotarod .....	46
<b>Figura 14.</b> Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA sobre as rotações induzidas por apomorfina .....	47
<b>Figura 15.</b> Efeitos da administração de L-Dopa sobre os prejuízos motores induzidos pelo traumatismo cranioencefálico (TCE) e a administração de 6-OHDA nos teste do campo aberto e rotarod .....	48
<b>Figura 16.</b> Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA sobre o tempo de catalepsia induzida por haloperidol .....	49
<b>Figura 17.</b> Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA sobre o comportamento de escalada induzido por apomorfina .....	50
<b>Figura 18.</b> Efeito do traumatismo cranioencefálico sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase no estriado de camundongos .....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais fármacos utilizados atualmente para o tratamento da doença de Parkinson .....	20
<b>Tabela 2.</b> Classificação e prognóstico do traumatismo cranioencefálico baseado na escala de coma de Glasgow .....	24
<b>Tabela 3.</b> Drogas utilizadas no presente estudo .....	34
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS) .....	36
<b>Tabela 5.</b> Comportamento de escalada induzido por apomorfina .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	-	6-hidroxidopamina
ANOVA	-	Análise de variância
BHE	-	Barreira hematoencefálica
COMT	-	Catecol O-metil transferase
COX-2	-	Ciclooxigenase do tipo 2
DA	-	Doença de Alzheimer
DAT	-	Transportador de dopamina
DP	-	Doença de Parkinson
ENS	-	Escore Neurológico de Severidade
GPe	-	Globo pálido externo
GPi	-	Globo pálido interno
i.p.	-	Intraperitoneal
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L-Dopa	-	Levodopa
LPS	-	Lipopolissacarídeo
MAO-A	-	Monoamino oxidase A
MAO-B	-	Monoamino oxidase B
MPP <sup>+</sup>	-	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	-	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAT	-	Transportador de noradrenalina
NST	-	Núcleo subtalamico
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
s.c.	-	Subcutâneo
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SNpc	-	Substância negra parte compacta
SNpr	-	Substancia negra parte reticulada
TCE	-	Traumatismo cranioencefálico
TH	-	Tirosina hidroxilase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Doença de Parkinson: epidemiologia, características neuropatológicas e sintomas.....	15
1.2 Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson ....	19
1.3 Etiologia da doença de Parkinson: ênfase no traumatismo cranioencefálico .....	23
1.4 Modelos animais para o estudo da doença de Parkinson – ênfase na 6-hidroxidopamina .....	28
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos Específicos .....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Animais e considerações éticas .....	32
3.2 Traumatismo cranioencefálico experimental.....	32
3.3 Drogas e tratamentos .....	33
3.4 Protocolo experimental.....	34
3.5 Determinação da permeabilidade da barreira hematoencefálica .....	35
3.6 Testes Comportamentais.....	36
3.6.1 Avaliação neurológica .....	36
3.6.2 Teste do campo aberto.....	37
3.6.3 Rotarod .....	38
3.7 Desafios farmacológicos.....	38
3.7.1 Rotações induzidas por apomorfina .....	38
3.7.2 Efeitos da administração aguda de L-Dopa sobre as alterações motoras induzidas pelo traumatismo cranioencefálico e/ou 6-OHDA.....	39

3.7.3 Catalepsia induzida por haloperidol .....	39
3.7.4 Comportamento de escalada induzido por apomorfina .....	40
3.8 Avaliações bioquímicas.....	40
3.8.1 Imunodeteccção de proteínas (Western Blot) .....	40
3.9 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) .....	43
4.2 Escore neurológico de severidade (ENS).....	43
4.3 Teste do campo aberto.....	44
4.4 Teste do rotarod.....	46
4.5 Rotações induzidas por apomorfina .....	47
4.6 Efeitos da administração de L-Dopa sobre as alterações motoras induzidas pelo TCE e/ou administração de 6-OHDA .....	47
4.7 Catalepsia induzida por haloperidol.....	49
4.8 Comportamento de escalada induzido por apomorfina .....	49
4.9 Imunodeteccção de proteínas (Western Blot) .....	50
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Parkinson: epidemiologia, características neuropatológicas e sintomas

O envelhecimento populacional, isto é, o crescimento da população com 60 anos ou mais, é um fenômeno mundial segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, dados do censo divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2008 mostram que 8,6% da população brasileira têm 60 anos de idade ou mais, representando aproximadamente 15 milhões de habitantes. Nos próximos 20 anos, ainda segundo o IBGE, o número de idosos no Brasil poderá ultrapassar a marca dos 30 milhões e deverá representar aproximadamente 13% da população brasileira. Embora estes números reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que num futuro próximo ocorra um aumento significativo do número de pessoas acometidas por patologias associadas ao envelhecimento (HEDDEN; GABRIELI, 2004).

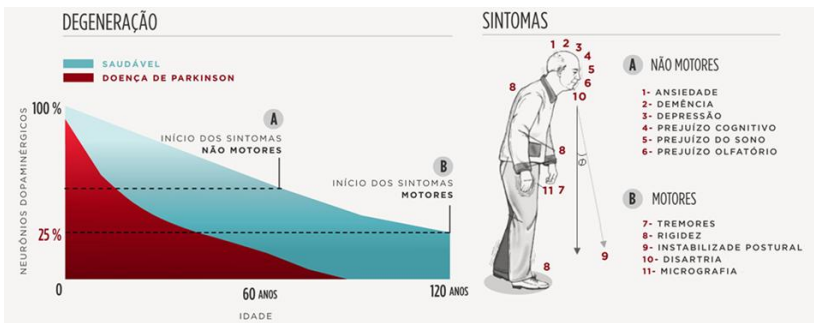
Dentre estas patologias, que são denominadas “males da idade”, destacam-se a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011). A DP é um distúrbio neurodegenerativo que afeta 1-2% da população acima dos 60 anos de idade, sendo que essa proporção aumenta com o avanço da idade (DE LAU; BRETELER, 2006). Nos Estados Unidos da América (EUA), existem aproximadamente 500 mil portadores da DP, e são reportados mais de 50 mil casos novos todos os anos (LANDRIGAN et al., 2005). Segundo o IBGE (2000), existem aproximadamente 220 mil parkinsonianos no Brasil; sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos de idade são acometidos por esta doença.

A primeira descrição formal da DP deu-se em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, onde ele descreveu os dois principais sintomas clínicos da doença (tremor em repouso e marcha festinante) em seu famoso trabalho “Ensaio da paralisia agitante” (PARKINSON, 1817).

Classicamente, a DP é uma patologia relacionada com prejuízos na função motora, sendo o seu diagnóstico baseado no aparecimento de sintomas motores cardinais (tremor de repouso, rigidez e bradicinesia) além de ser caracterizada por uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra parte compacta (SNpc) para o estriado (via nigroestriatal). Entretanto, os sintomas motores somente se tornam evidentes quando o processo

neurodegenerativo já comprometeu cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, verificando-se uma redução de aproximadamente 80% dos níveis de dopamina no estriado (Figura 1) (FEARNLEY; LEES, 1991; DE LA FUENTE-FERNANDEZ et al., 2011).

Por outro lado, atualmente é sabido que a DP não afeta somente neurônios dopaminérgicos da via nigrostriatal, como também outros sistemas de neurotransmissão, como os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico, sendo que o desequilíbrio desses sistemas contribui para o aparecimento dos sintomas não-motores da DP (MCDOWELL; CHESSELET, 2012). Em seu estudo pioneiro, James Parkinson relatou também a presença de sintomas não-motores que acompanhavam os pacientes parkinsonianos, tais como: distúrbio do sono, constipação, disartria, disfonia, sialorréia, incontinência urinária, além de sonolência acompanhada por delírio (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006). Com o avanço no conhecimento sobre a DP, atualmente é sabido que muitos sintomas não-motores da DP antecedem o aparecimento dos sintomas clássicos motores. Neste sentido, a existência de diferentes estágios na DP ganhou maior importância na última década a partir dos trabalhos pioneiros de Braak e colaboradores (2003) que classificaram a DP em 6 estágios com base nas diferentes áreas cerebrais afetadas e sintomas associados à cada estágio (Figura 1) (BRAAK et al., 2003; CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006). Neste sentido, existe a esperança de que o avanço do conhecimento acerca desses sintomas iniciais da DP permitira que no futuro o diagnóstico seja feito mais precocemente, permitindo assim que novas abordagens terapêuticas sejam introduzidas quando o processo neurodegenerativo não esteja tão avançado (PREDIGER et al., 2010; BHIDAYASIRI; TRUONG, 2012).





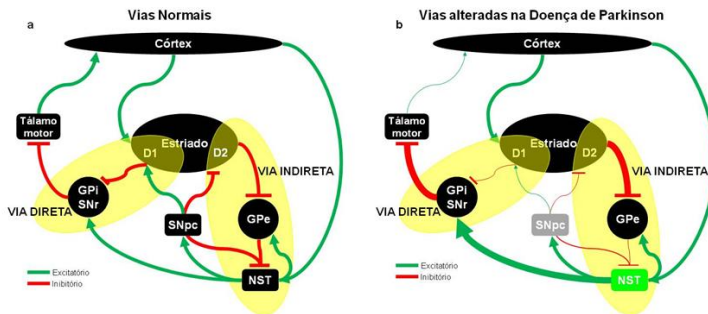
**Figura 1.** Ilustração das principais características da doença de Parkinson: neurodegeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos e o aparecimento dos sintomas motores e não-motores. Adaptada de Braak e colaboradores (2003).

Como já descrito anteriormente, na DP verifica-se a morte dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra parte compacta (SNpc), causando um desequilíbrio dos circuitos neuronais dos gânglios basais ou também conhecidos como núcleos basais, formado pelo estriado dorsal e ventral, globo pálido interno (GPi) e externo (GPe), SNpc e substância negra parte reticulada (SNpr) e o núcleo subtalâmico (NST) (BLANDINI et al., 2000). Os gânglios basais estão situados no mesencéfalo formando uma rede difusa de interconexões, que integram áreas corticais, regiões associativas, sistema límbico e oculomotor, o tálamo e regiões motoras.

Os neurônios estriatais recebem muitas aferências, predominantemente glutamatérgicas, de áreas corticais, talâmicas e límbicas, além de aferências dopaminérgicas do mesencéfalo da área tegmentar ventral e da SNpc e enviam eferências gabaérgicas para a SNpr, GPi e GPe. As sinapses glutamatérgicas servem como gatilho, enquanto que as sinapses gabaérgicas servem como um freio dos circuitos estriatais, já as sinapses dopaminérgicas apresentam um papel modulatório sobre a neurotransmissão glutamatérgica e gabaérgica (SCHIFFMANN et al., 2007).

Regiões corticais motoras enviam projeções para o estriado, especialmente para o estriado dorsal. Do estriado partem projeções (denominada via direta) especialmente para o GPi e SNpr. Os neurônios dessa via expressam predominantemente receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub>, além de co-liberarem substância P e dinorfina. Esta via fornece um efeito direto inibitório sobre os neurônios do GPi e SNpr, assim reduzindo o efeito inibitório destes núcleos (GPi e SNpr) sobre o tálamo e permitindo a execução dos movimentos. Já a via denominada indireta conecta o estriado ao GPe e NST. Neurônios da via indireta expressam predominantemente receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> e co-liberam encefalina. A estimulação desta via acaba por promover uma inibição do GPe, desinibição dos NST e excitação da GPi e SNpr, aumentando o efeito inibitório sobre o tálamo, levando a uma supressão dos movimentos (ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986; GERFEN; KEEFE; GAUDA, 1995; OBESO et al., 2000; XIE; RAMKUMAR; TOTH, 2007) (Figura 2A).

De acordo com esse modelo clássico de vias diretas e indiretas, a redução nos níveis de dopamina nos gânglios basais verificados na DP acaba reduzindo tanto a inibição da via indireta quanto à excitação da via direta. Este resultado da ativação excessiva do GPi e SNpr, inibição do tálamo e de sistemas do tronco cerebral motor leva ao surgimento dos sintomas motores característicos na DP (Figura 2B). Este é um esquema simples que serve como ponto de partida para melhor entendermos o que ocorre na fisiopatologia da DP, embora esteja ainda longe de representar fielmente a complexidade dos mecanismos associados ao aparecimento dos sintomas motores e não-motores na DP (HIRSCH et al., 2000; OBESO et al., 2006).



**Figura 2.** Figura esquemática dos gânglios basais, A vias normais e B vias alteradas na doença de Parkinson.

Setas verdes indicam neurotransmissão excitatória, setas vermelhas indicam neurotransmissão inibitória. O córtex envia aferências glutamatérgicas. O estriado comunica-se com o globo pálido interno (GPi) e substância negra parte reticulada (SNr) pela via direta e com o núcleo subtalâmico (NST) e globo pálido externo (GPe) pela via indireta. A dopamina age inibindo a via indireta e estimulando a via direta. Na doença de Parkinson, a depleção nos níveis de dopamina faz com que ocorra desinibição dos receptores D<sub>2</sub> da via indireta, levando a uma inibição excessiva do GPe e desinibição do NST. A hiperatividade do NST leva a uma excitação excessiva do GPi e SNr, que por consequência inibem excessivamente os centros motores tálamo-corticais e do tronco cerebral levando aos sintomas motores da doença de Parkinson, adaptado de Obeso e colaboradores (2000).

Além da neurodegeneração da via nigroestriatal, outro marcador neuropatológico da DP é a presença de corpos de Lewy. Os corpos de Lewy são estruturas intracitoplasmáticas eosinofílicas, com um núcleo denso rodeado por um halo, formados principalmente pelo acúmulo da proteína  $\alpha$ -sinucleína, além de ubiquitina, parkina e neurofilamentos. Apesar de sua presença não ser exclusiva da DP, ela é considerada um marcador neuropatológico da DP sendo utilizada no diagnóstico definitivo desta doença (Figura 3) (VENDA et al., 2010).



**Figura 3.** Figura ilustrando as principais características neuropatológicas da doença de Parkinson: perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) e a formação dos corpos de Lewy. Adaptada de Prediger e colaboradores (2011).

### 1.2 Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson

A terapia atual para o tratamento da DP está limitada ao alívio dos sintomas apresentados pelos pacientes, e até o momento nenhuma terapia foi capaz de inibir ou reverter o avanço do processo neurodegenerativo. Como a depleção da dopamina é a principal responsável pelos sintomas motores da DP, o tratamento farmacológico tem sido baseado em restaurar os níveis deste neurotransmissor, sendo que a maioria dos agentes utilizados atualmente para o tratamento da DP estão relacionados com a modulação da síntese e degradação da dopamina, ou, alternativamente, com a estimulação dos receptores dopaminérgicos, ver Tabela 1 (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

**Tabela 1.** Principais fármacos utilizados atualmente para o tratamento da doença de Parkinson

<b>Fármaco (nome comercial)</b>	<b>Posologia inicial</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
L-Dopa (SINEMET <sup>®</sup> )	25/100 mg (carbidopa/L-Dopa, 3 x ao dia)	Precursor da dopamina
Bromocriptina (PARLODEL <sup>®</sup> )	1,5 mg, 2 x ao dia	Agonista dopaminérgico
Pramipexol (MIRAPEX <sup>®</sup> )	0,125 mg, 3 x ao dia	Agonista dopaminérgico
Entacapone (COMTAN <sup>®</sup> )	200 mg, até 5 x ao dia	Inibidor da catecol-O-metiltransferase
Rasagilina (AZILECT <sup>®</sup> )	1 mg, por dia	Inibidor da monoamino oxidase B
Selegilina (DEPRENIL <sup>®</sup> )	5 mg, 2 x ao dia	Inibidor da monoamino oxidase B
Amantadina (SYMMETREL <sup>®</sup> )	100 mg, 2 x ao dia	Inibidor da liberação/captação de dopamina
Biperideno (AKINETON <sup>®</sup> )	1 mg, 2 x ao dia	Antagonista colinérgico dos receptores muscarínicos

**Tabela 1.** Adaptado de (KATZUNG, 2005).

O cientista sueco Arvid Carlsson mostrou na década de 1950 que a Levodopa (L-Dopa) é eficaz no alívio da síndrome parkinsoniana, sendo que este representa até os dias atuais o maior avanço terapêutico na DP. A L-Dopa é um fármaco precursor da dopamina, sendo considerado o tratamento padrão ouro na DP. Após sua administração via oral, a L-Dopa é absorvida pelo intestino, entra na corrente sanguínea, atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e é descarboxilada à dopamina em neurônios dopaminérgicos. Comumente, a L-Dopa é administrada em associação a um inibidor periférico da enzima dopadescarboxilase (ex: carbidopa e benserazida), evitando assim a sua conversão em dopamina nos tecidos periféricos e a perda da sua eficácia terapêutica. A L-Dopa é efetiva em melhorar a função motora, as atividades diárias e a qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos. Por outro lado, existem sintomas da DP que não são controlados de forma satisfatória ou não respondem a L-Dopa, como a

instabilidade postural e quedas, episódios de congelamento, distúrbios do humor e sono, disfunção autonômica e demência (SETHI, 2008; OLANOW; STERN; SETHI, 2009).

O tratamento crônico com L-Dopa está associado com o desenvolvimento de complicações motoras em grande parte dos pacientes, destacando-se as flutuações motoras do tipo “liga e desliga” e as discinesias (movimentos involuntários de contração muscular). Estas complicações afetam aproximadamente 40 – 50% dos pacientes após 5 anos do início do tratamento com a L-Dopa, além de vários outros efeitos indesejáveis como náuseas, vômito e arritmia cardíaca, que estão associados com a sua degradação periférica, promovendo assim possíveis flutuações em sua biodisponibilidade. Todos esses efeitos podem causar incapacidade grave e falta de adesão ao tratamento em alguns pacientes (SETHI, 2008).

Os agonistas dopaminérgicos têm atraído especial interesse para o tratamento da DP pois apresentam uma boa eficácia terapêutica associada a uma redução nas complicações motoras relacionadas ao uso crônico da L-Dopa. Os agonistas dopaminérgicos têm sido usados como monoterapia para o tratamento dos sintomas motores na DP, além de retardarem o aparecimento das complicações motoras, como as discinesias que ocorrem com a L-Dopa. Dentre as principais vantagens em comparação com a L-Dopa estão a sua similaridade com a molécula da dopamina, sendo que as suas ações não necessitam da conversão enzimática a um metabólito ativo, agindo diretamente nos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos, além de poderem estimular subtipos específicos de receptores dopaminérgicos. Os principais efeitos adversos induzidos por agonistas dopaminérgicos são náusea, vômito, excessiva sonolência diurna e hipotensão postural, além de edema e ganho de massa corporal, e uma maior incidência de psicoses e alucinações em relação a L-Dopa (OLANOW; STERN; SETHI, 2009). Todavia, em alguns casos, o tratamento com agonistas dopaminérgicos demonstra ser menos eficaz que o tratamento com L-Dopa, sendo necessária a suplementação com L-Dopa (CLARKE, 2003).

Outro grupo de agentes utilizados para o tratamento da DP são os inibidores da catecol O-metil transferase (COMT). Geralmente emprega-se este tratamento em associação com a L-Dopa, pois seu mecanismo de ação acaba por inibir a degradação da L-Dopa na periferia, reduzindo os níveis periféricos de dopamina, além de aumentar o tempo de meia vida de 90 min para 3 horas, aumentando o intervalo de administração da L-Dopa. A principal vantagem desta

classe de fármacos é a redução das flutuações motoras induzidas por L-Dopa, enquanto o seu principal efeito colateral é a presença de diarreia explosiva, além de descoloração da urina (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007; KALINDERI et al., 2011).

A amantadina, embora não tenha seu mecanismo inteiramente elucidado, surgiu como um fármaco antiviral com possível atividade antiparkinsoniana, sendo o único fármaco disponível na clínica para a atenuação das discinesias induzidas pela L-Dopa. Entretanto seu uso está restrito a esse propósito, uma vez que causa comprometimentos cognitivos principalmente em pacientes em estágios avançados da DP e os seus benefícios podem ser transitórios (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007; KALINDERI et al., 2011).

Os inibidores da MAO-B fazem com que os níveis de dopamina aumentem na fenda sináptica, tendo como principal vantagem a redução de flutuações motoras, além de apresentarem efeitos neuroprotetores em animais de laboratório (embora este potencial neuroprotetor não tenha ainda sido confirmado em humanos). Sua principal desvantagem é o modesto efeito antiparkinsoniano, e o risco de causar crises hipertensivas (“efeito queijo”) (OLANOW; WATTS; KOLLER, 2001; OLANOW; STERN; SETHI, 2009).

Uma vez que na DP é observado um desequilíbrio entre a neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica, os anticolinérgicos são utilizados na tentativa de restabelecer o equilíbrio da neurotransmissão nos gânglios da base (DUVOISIN, 1967). Os anticolinérgicos são efetivos em atenuar os tremores associados à DP, mas apresentam muitos efeitos colaterais como déficits cognitivos, constipação, náuseas, arritmias e hipertrofia prostática, que estão entre as principais desvantagens do uso desta classe de fármacos (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007; SCHAPIRA, 2009).

É importante ser destacado que até o momento nenhuma destas classes de fármacos apresentou efeito neuroprotetor comprovado, sendo incapazes de bloquear ou reverter o processo neurodegenerativo que continua a progredir. Neste sentido, existe um crescente interesse por pesquisadores e pela indústria farmacêutica para a descoberta de novos alvos terapêuticos e moléculas capazes de promoverem um efeito neuroprotetor ou até mesmo a cura desta patologia.

### **1.3 Etiologia da doença de Parkinson: ênfase no traumatismo cranioencefálico**

Apesar do grande avanço do conhecimento sobre a DP nos últimos anos, ainda não se descobriu a sua causa primária. Alguns autores relatam que a DP é um excelente modelo de uma desordem neurológica multifatorial na qual existe uma combinação de diversos fatores, tais como envelhecimento, susceptibilidade genética e fatores ambientais que interagem de diferentes formas para causarem a neurodegeneração e, por consequência, a DP (VENDA et al., 2010). Aproximadamente 10% dos casos da DP apresentam origem genética, sendo que os 90% restantes estariam relacionados com a forma esporádica da DP (DI MONTE; LAVASANI; MANNING-BOG, 2002; DE LAU; BRETELER, 2006). O envelhecimento é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento da DP, destacando-se também à exposição a pesticidas, vírus, câncer, consumo de álcool, tabagismo, metais pesados e de acordo com muitos trabalhos, o traumatismo cranioencefálico (TCE) (HOROWITZ; GREENAMYRE, 2010; HUTSON et al., 2010; PREDIGER et al., 2011; WIRDEFELDT et al., 2011).

O TCE é definido como uma agressão ao cérebro causada por trauma físico externo, onde sua definição clínico-epidemiológica exige manifestações de acometimento encefálico, tais como alteração do nível de consciência, amnésia, desorientação, déficits neurológicos, anormalidades em exames de neuroimagem, ou mesmo morte imediata. O TCE é um problema mundial de saúde pública que já foi denominado “epidemia silenciosa” em razão da natureza das sequelas, que com frequência não são prontamente evidentes, além do limitado conhecimento científico a respeito da fisiopatologia e características clínicas, e do baixo nível de informação do público sobre o assunto (GOLDSTEIN, 1990). O TCE apresenta uma elevada e crescente incidência nos dias atuais, representando uma importante causa de morbidade em adolescentes e jovens adultos (CORRIGAN; SELASSIE; ORMAN, 2010).

As taxas epidemiológicas são alarmantes: no mundo são estimados 10 milhões de novos casos por ano (SIGNORINI et al., 1999) e estima-se que 2% da população mundial sofra com os problemas crônicos inerentes ao traumatismo cerebral, isso é o equivalente a 120 milhões de indivíduos (RAGNARSSON, 2002). Nos EUA, estima-se que a cada ano ocorram 1,4 milhões de novos casos, com mais de 50 mil óbitos, 235 mil hospitalizações sem ocorrência de óbito e cerca de 5,3

milhões de pessoas que convivem com alguma sequela de longo prazo. De maneira importante, o custo direto e indireto anual com o TCE ultrapassa os 56 bilhões de dólares nos EUA (LANGLOIS; RUTLAND-BROWN; WALD, 2006; CORRIGAN; SELASSIE; ORMAN, 2010). Na Europa, calcula-se que a ocorrência de 1,6 milhões de novos casos anualmente, com taxas de mortalidade de 6,4% do total de novos casos (SVESTKOVA et al., 2010). No Brasil, existe uma escassez de dados epidemiológicos, porém um estudo realizado em Brasília (DF) relatou uma incidência de 341 casos por 100 mil habitantes, sendo essa taxa elevada atribuída à grande frequência de acidentes de trânsito (MASINI, 1994). Segundo o maior estudo brasileiro, realizado no estado de Santa Catarina por Martins e colaboradores, a mortalidade hospitalar no TCE grave aproxima-se dos 30% (MARTINS et al., 2009). O tema é alvo de políticas específicas de saúde pública e de fomento para pesquisa básica e clínica em diversos países, inclusive no Brasil.

A principal classificação do TCE ocorre através da escala de coma de Glasgow, que examina a resposta do paciente a níveis crescentes de estímulos (TEASDALE; JENNETT, 1974), podendo ser classificado como leve, moderado ou grave, sendo que 60% dos casos de TCE são leves, 20% moderados e 20% graves; tabela 2 (LANGLOIS; RUTLAND-BROWN; WALD, 2006).

**Tabela 2.** Classificação e prognóstico do TCE baseado na escala de coma de Glasgow

<b>Tipo de trauma</b>	<b>Pontuação na escala de Glasgow</b>	<b>Prognóstico</b>
Leve	13-15	Comprometimento de consciência transitório e menos intenso, recuperação de 3 – 18 meses, baixo risco de sequelas em longo prazo
Moderado	9-12	*não avaliado
Grave	3-8	Alto índice de mortalidade e 50% dos pacientes apresentam sequelas em longo prazo que levam ao comprometimento funcional

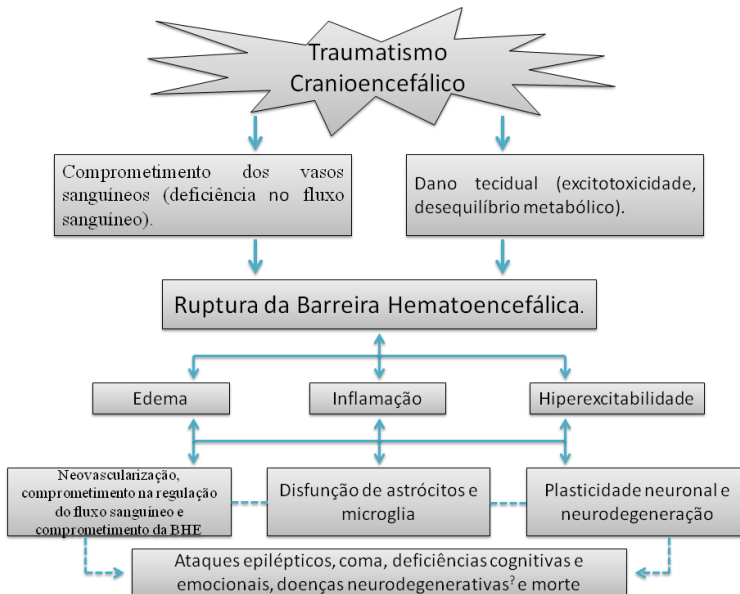
Tabela adaptada de (VOS et al., 2002; CARROLL et al., 2004; MARMAROU et al., 2007)



Além da classificação pela gravidade clínica, o TCE também pode ser classificado cronologicamente em lesões primárias e secundárias. Lesões primárias são definidas como aquelas que ocorrem no momento do impacto (por exemplo: laceração do tecido decorrente do impacto). Lesões secundárias são aquelas que ocorrem após a lesão inicial (por exemplo: edema, isquemia, infecções após TCE), como consequência de respostas fisiológicas e patológicas decorrentes da lesão primária e alguns de seus mecanismos neuropatológicos podem se prolongar por meses ou anos (GEAN; FISCHBEIN, 2010). As sequelas após o TCE estão diretamente relacionadas com a lesão primária ou secundária, onde a variedade de mecanismos e danos cerebrais, associadas a outras situações frequentemente concomitantes (infecções, tromboembolismo, choque, etc) tornam cada TCE um fenômeno único e dinâmico (WERNER; ENGELHARD, 2007; GEAN; FISCHBEIN, 2010).

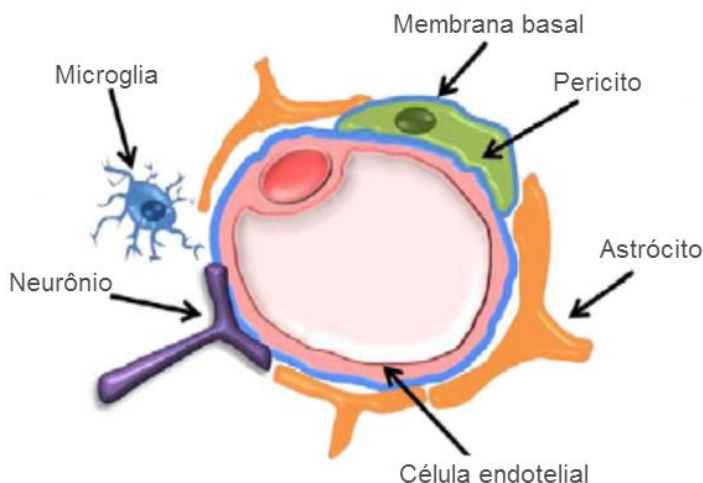
Dentre os fenômenos mais importantes que ocorrem na lesão primária estão lacerações, contusões cerebrais, hemorragia, estiramento axonal causando comprometimento funcional, além de levar a um processo denominado mecanoporação, processo pelo qual os neurônios se deformam promovendo a abertura de poros da membrana celular, ocorrendo então a saída de íons, que por consequência provocam despolarização da membrana neuronal e ativação de diversas vias intracelulares (FITZPATRICK et al., 1998; BARBEE, 2005; KELLEY et al., 2006).

Na lesão secundária destacam-se a perturbação na formação de potenciação de longo prazo, disfunção na neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica, toxicidade por acúmulo protéico (SCHWARZBACH et al., 2006; BALES et al., 2009; LOANE et al., 2009), além de comprometimento do fluxo sanguíneo, edema, hipoxia e isquemia (LUSARDI, 2009), excitotoxicidade, estresse oxidativo, neuroinflamação, astrogliose e microgliose (DIXON et al., 1995; YI; HAZELL, 2006; SHLOSBERG et al., 2010). Todos estes fenômenos acabam agindo sinergicamente gerando uma reação em cadeia, comprometendo a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (Figura 4) (SHLOSBERG et al., 2010).



**Figura 4.** Eventos fisiopatológicos associados ao traumatismo cranioencefálico. Os primeiros eventos seriam o comprometimento dos vasos e irregularidades no fluxo sanguíneo, levando a um desequilíbrio metabólico, hipóxia, isquemia, e excitotoxicidade. Estes processos estão relacionados com a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), levando a uma complexa interação entre os processos patológicos. A interação destes fatores resulta em edema, resposta inflamatória local, e aumento da excitabilidade neuronal. Estes eventos iniciais podem progredir, interagir e iniciar complicações mais agudas. Em paralelo podem ocorrer mudanças na rede neural e disfunção de astrócitos, subjacentes ao desenvolvimento de epilepsias, transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Adaptado de (SHLOSBERG et al., 2010).

A disfunção da BHE é uma característica comum e está relacionada com a gravidade do TCE tanto em humanos quanto em modelos animais. A fisiologia e função da BHE (ver Figura 5) vêm sendo estudada há décadas através de diferentes tipos de abordagens (KOSTRZEWA, 2007).



**Figura 5.** Figura esquemática da unidade neovascular da barreira hematoencefálica que é composta por microglia, neurônios, célula endotelial, astrócito, pericito e membrana basal. Adaptado de Cardoso e colaboradores, 2010.

A perturbação da integridade da BHE devido à lesão primária e/ou secundária vem sendo relatada como um fator que contribui para o desenvolvimento e progressão da DP (POPESCU et al., 2009; CHEN; GHRIBI; GEIGER, 2010). A ruptura da BHE devido ao TCE, segundo dados experimentais, resulta na morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra (POPESCU et al., 2009). De acordo com Braak (2002), danos na BHE podem aumentar a incidência da DP, uma vez que o sistema nervoso central (SNC) ficaria mais exposto a toxinas ambientais, sendo esta a principal hipótese do presente trabalho. Trabalhos recentes têm mostrado que após o TCE ocorre um aumento da entrada de metais pesados, como ferro e manganês, e também de agrotóxicos como o paraquate, no sistema nervoso central (SNC) levando a neurodegeneração da via nigroestriatal (POPESCU et al., 2009; CHEN; GHRIBI; GEIGER, 2010; PREDIGER et al., 2011).

Desde as décadas de 1920 e 1930, levantamentos de casos vêm sendo publicados especulando sobre a associação entre o TCE e a DP, e um número crescente de estudos de coorte vem sendo publicado nos últimos 20 anos apresentando uma relação entre 0,6 e 6,2 para a DP após o TCE (RUGBJERG et al., 2008). O caso clínico mais citado como exemplo da relação entre TCE e a DP é do ex-lutador americano de

boxe Muhammad Ali (nascido Cassius Marcellus Clay Jr.) (LOLEKHA; PHANTHUMCHINDA; BHIDAYASIRI, 2010). Estudos em animais de laboratório evidenciam a redução de aproximadamente 45% da ligação ao transportador de dopamina (DAT) no estriado após o TCE (DONNEMILLER et al., 2000; WILSON et al., 2005), além da redução da marcação para a enzima tirosina hidroxilase (TH) na substância negra (indicativo de morte neuronal), acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína e respostas neuroinflamatórias (HUTSON et al., 2010). Essas alterações são semelhantes aquelas observadas em pacientes com a DP (JOYCE et al., 1997; BALES et al., 2009).

Estas observações sugerem que o TCE pode representar um fator de risco importante para a DP. Além disso, o TCE pode ser um elemento de sensibilização neuronal para outros fatores de risco, como por exemplo, toxinas ambientais, como sugere a hipótese de múltiplos danos descrita por Sulzer (2007) para a DP, onde o TCE tem sido associado ao aumento da vulnerabilidade neuronal a um dano posterior (SULZER, 2007; HUTSON et al., 2010).

#### **1.4 Modelos animais para o estudo da doença de Parkinson – ênfase na 6-hidroxidopamina**

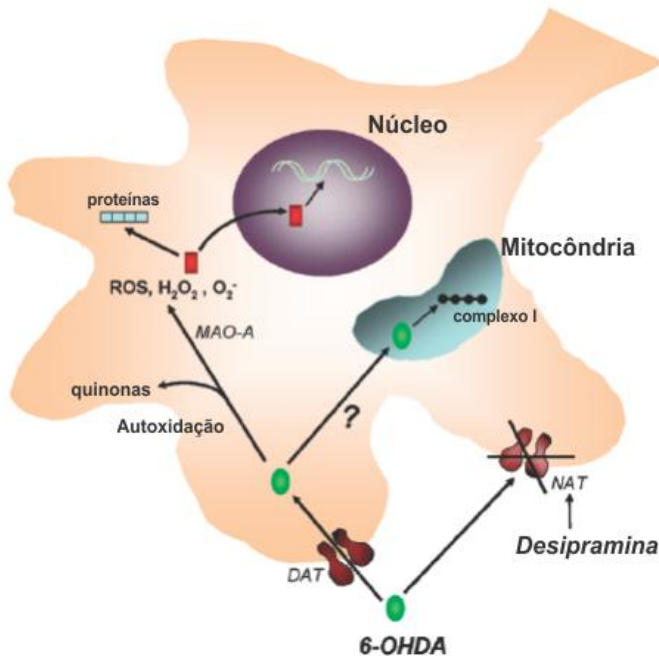
Diversos modelos animais têm sido empregados para o estudo da DP. Estes modelos consistem basicamente em manipulação farmacológica (ex: reserpina) (CARLSSON, 2001), aplicação de toxinas (MPTP, rotenona, paraquate) (PREDIGER et al., 2011) e manipulações genéticas (animais nocautes para PINK1, PARK7, parkin e mutantes como Thy1-asyn, que superexpressam a forma tóxica da  $\alpha$ -sinucleína) (para revisão de modelos genéticos ver Chesselet et al., 2011).

A maioria das neurotoxinas utilizadas para mimetizar a DP tem como alvo o complexo mitocondrial. O complexo I mitocondrial é o principal alvo da rotenona, o manébe tem como alvo principal o complexo III, enquanto as alterações causadas pelo paraquate estariam relacionadas com alterações na cadeia redox no citosol (WESTERLUND; HOFFER; OLSON, 2010). Outra neurotoxina importante para o estudo experimental da DP é o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). O MPTP se difunde através da BHE, sendo oxidado e convertido em seu metabólito tóxico, o 1-metil-4-fenilperidina (MPP<sup>+</sup>) em astrócitos através da ação da enzima MAO-B. Posteriormente, o MPP<sup>+</sup> é captado para o interior do neurônio

dopaminérgico através do DAT e sua ação ocorre através da inibição do complexo I da cadeia respiratória (PREDIGER et al., 2010).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um análogo hidroxilado da dopamina, teve seus primeiros efeitos biológicos relatados há mais de 45 anos, quando Porter e colaboradores mostraram que essa neurotoxina poderia induzir de forma eficiente e duradoura a depleção noradrenérgica em nervos simpáticos do coração de camundongos (PORTER; TOTARO; STONE, 1963). Poucos anos após esta descoberta, Ungerstedt demonstrou que a injeção de 6-OHDA na SNpc era capaz de causar uma neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos, dando origem ao primeiro modelo animal da DP (UNGERSTEDT, 1968). Desde então, este modelo vem sendo amplamente empregado para mimetizar a degeneração dopaminérgica na SNpc observada na DP.

Uma vez que a 6-OHDA não ultrapassa a BHE, ela é comumente administrada pela via intracerebroventricular ou diretamente no estriado ou na SNpc, e, dependendo do seu local de injeção e da concentração utilizada, é capaz de promover uma degeneração dopaminérgica variável na SNpc, podendo ultrapassar 90% de perda neuronal (LEE; SAUER; BJÄRKLUND, 1996). Os danos neuronais causados por esta neurotoxina ocorrem principalmente devido a indução de estresse oxidativo, e a sua semelhança com a molécula da dopamina lhe confere um alto grau de afinidade com o DAT, sendo captada nos terminais dopaminérgicos por este transportador (Figura 6). A 6-OHDA é comumente administrada em associação com bloqueadores do transportador de noradrenalina, como a desipramina, para que a captação e a neurodegeneração seja direcionada para neurônios dopaminérgicos. Após ser captada pelo neurônio, a 6-OHDA é acumulada no citosol e sofre um processo de auto-oxidação, promovendo uma grande formação de radicais livres, principalmente peróxido de hidrogênio (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Outro mecanismo de toxicidade induzido pela 6-OHDA está relacionado ao seu acúmulo nas mitocôndrias, onde inibe a atividade da cadeia transportadora de elétrons através do bloqueio do complexo I (Figura 6) (SCHÖBER, 2004; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).



**Figura 6.** Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Após ser captada do espaço extracelular pelo transportador de dopamina (DAT) ou pelo transportador de noradrenalina (NAT), a 6-OHDA é armazenada nos neurônios catecolaminérgicos. No interior dos neurônios, a 6-hidroxidopamina sofre degradação enzimática pela monoamino oxidase A (MAO-A) e autooxidação, que acabam gerando várias espécies citotóxicas que danificam proteínas citoplasmáticas e o núcleo promovendo dano neuronal. Além disso, a 6-OHDA pode induzir neurotoxicidade ao alterar a atividade do complexo I mitocondrial. A 6-OHDA é comumente administrada em associação com bloqueadores do transportador de noradrenalina, como a desipramina, para que a captação e a neurodegeneração seja direcionada para neurônios dopaminérgicos. Adaptado de (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007)

Diante do exposto acima, o presente estudo buscou avaliar o TCE como um fator de predisposição para o desenvolvimento de alterações comportamentais e bioquímicas em camundongos submetidos ao modelo experimental da 6-OHDA.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar o papel do traumatismo cranioencefálico como um fator de predisposição da doença de Parkinson em camundongos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Investigar os efeitos do TCE sobre a disfunção da barreira hematoencefálica através da detecção da permeabilidade do corante azul de Evans por fluoroespectofotometria.

Avaliar a evolução neurológica dos animais durante as quatro primeiras semanas após o TCE e/ou a administração da neurotoxina 6-OHDA, através da avaliação do escore neurológico de severidade.

Investigar os possíveis prejuízos motores induzidos pelo TCE e/ou pela administração da neurotoxina 6-OHDA em camundongos através dos testes comportamentais do campo aberto e rotarod.

Investigar os efeitos do tratamento agudo com L-Dopa sobre os prejuízos motores induzidos pelo TCE e/ou pela administração de 6-OHDA em camundongos avaliados nos testes do campo aberto e do rotarod.

Investigar se o TCE e/ou a administração de 6-OHDA são capazes de induzir comportamento rotacional (indicativo de hemiparkinsonismo), através do teste de rotações induzidas por apomorfina em camundongos.

Investigar as possíveis alterações de sensibilidade dos receptores dopaminérgicos após o TCE e/ou a administração de 6-OHDA em camundongos através de desafios farmacológicos com haloperidol (comportamento cataléptico) e apomorfina (comportamento de escalada).

Investigar o efeito do TCE e/ou da administração de 6-OHDA sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase no estriado de camundongos através da técnica da imunodeteção de proteínas (western blot).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e considerações éticas**

Foram utilizados camundongos albinos machos com 3 a 4 meses de idade e pesando entre 40 e 50 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados (Insight, Ribeirão Preto) sob temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara 7:00-19:00 h) no biotério do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), Departamento de Farmacologia – UFSC, com livre acesso à água e ração, em um número máximo de 15 animais por gaiola plástica retangular (49 x 34 x 16 cm).

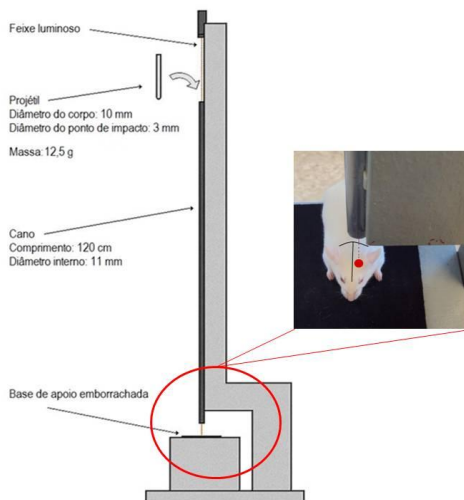
Todos os procedimentos realizados no presente estudo estão de acordo com as normas de conduta para uso de animais de laboratório, sendo que a realização do presente estudo foi aprovada pelo Comitê de ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número PP00451/2010). O número de animais utilizado em cada experimento foi o mínimo necessário para a obtenção de resultados confiáveis com análise estatística adequada.

#### **3.2 Traumatismo cranioencefálico experimental**

O TCE experimental foi induzido através de um modelo de queda de peso. O aparato, inicialmente desenvolvido junto à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, foi aprimorado e padronizado em nosso laboratório por (SCHWARZBOLD et al., 2010) (Figura 7). Os animais foram anestesiados com isoflurano pela via inalatória (0,96%; Laboratórios Abbott, SP, São Paulo) e posicionados manualmente sobre uma superfície emborrachada sob um cano vertical de 120 cm de comprimento. Um projétil de alumínio foi solto em queda livre através do tubo, provocando um impacto direto na região frontoparietal do hemisfério esquerdo dos animais (ver Figura 7). A superfície de contato do projétil era plana, livre de irregularidades, com 3 mm de diâmetro. Um feixe luminoso indicou o local do impacto. A massa do projétil foi



de 12,5 g, sendo este capaz de induzir um trauma moderado nos animais (SCHWARZBOLD et al., 2010). Após a indução do TCE os animais retornavam às suas gaiolas moradia. Os animais do grupo controle foram submetidos a todos os procedimentos, exceto o impacto do projétil.



**Figura 7.** Aparato utilizado para indução do traumatismo cranioencefálico experimental e representação do local do impacto.

### 3.3 Drogas e tratamentos

Para realização do presente estudo utilizou-se o cloridrato de 6-OHDA, uma neurotoxina que atua em neurônios catecolaminérgicos (UNGERSTEDT, 1968), administrada 5 h após a indução do TCE pela via intraperitoneal (i.p.) na dose de 100 mg/kg (CLARK; LAVERTY; PHELAN, 1972). Trinta minutos antes da administração de 6-OHDA, todos os animais receberam a injeção de hidrocloreidrato de desipramina (25 mg/kg, i.p.), um inibidor não-seletivo dos transportadores de noradrenalina e serotonina, com o objetivo de inibir a captação da 6-OHDA por neurônios noradrenérgicos (DAY et al., 2002).

Na Tabela 3 são listadas as doses e resumidamente o mecanismo de ação das drogas que foram utilizadas nos testes farmacológicos no presente estudo.

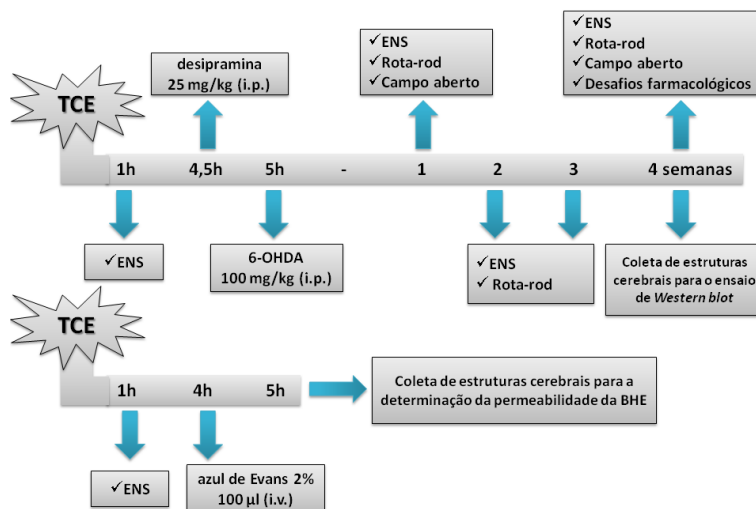
**Tabela 3.** Drogas utilizadas no presente estudo.

<b>Droga</b>	<b>Dose e via de administração</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Cloridrato de R(-)-apomorfina	0,3 e 3 mg/kg (s.c.)	Agonista não-seletivo dos receptores para dopamina
Haloperidol	0,5 mg/kg (i.p.)	Antagonista não-seletivo dos receptores para dopamina
Cloridrato do éster metílico de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa)	25 mg/kg (i.p.)	Precursor da dopamina
Cloridrato de Benzerazida	12,5 mg/kg (i.p.)	Inibidor periférico da enzima dopa descarboxilase

Para as soluções de 6-OHDA e R(-)-apomorfina, o metabissulfito de sódio 0,1% em solução livre de oxigênio foi utilizado como veículo para prevenir a oxidação (DAY et al., 2002). Para as demais drogas utilizou-se salina (NaCl 0,9%) como veículo. As drogas foram administradas no volume de 10 ml/kg de massa corporal dos animais.

### **3.4 Protocolo experimental**

Após a realização do TCE e da administração i.p. de 6-OHDA, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para avaliar suas funções motora e neurológica, além de desafios farmacológicos para avaliação da sensibilidade dos receptores dopaminérgicos, e ao final de 4 semanas os animais foram sacrificados para a realização de experimentos neuroquímicos, como pode ser visualizado na Figura 8.



**Figura 8.** Esquema dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental. Traumatismo cranioencefálico (TCE), escore neurológico de severidade (ENS), barreira hematoencefálica (BHE).

### 3.5 Determinação da permeabilidade da barreira hematoencefálica

O protocolo utilizado para determinação da integridade da BHE após a indução do TCE foi realizado conforme descrição prévia da literatura (UYAMA et al., 1988; FLIERL et al., 2009). Após 4,5 h da indução do TCE, alguns animais foram anestesiados com isoflurano inalatório (0,96%; Laboratórios Abbott, SP, São Paulo), em seguida receberam 100 µl do corante azul de Evans 2% (i.v.) diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). O azul de Evans forma um complexo com a albumina sérica, originando compostos com peso molecular superiores a 60 kDa, que em condições normais não atravessam a BHE. Deixou-se o corante circular por 1 h e então os animais foram perfundidos com solução salina. Os cérebros foram retirados, descartou-se o cerebelo e o tronco cerebral e os dois hemisférios foram separados sagitalmente e em seguida pesados.

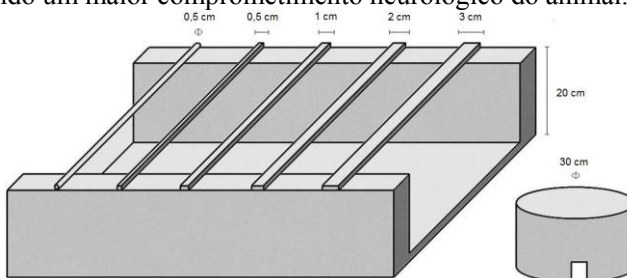
Os hemisférios foram homogeneizados em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 50% por 5 min; as amostras foram centrifugadas a 3000g a 4°C por 20 min e o sobrenadante foi diluído em etanol P.A. na

proporção 1:4 (v/v), as amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* e uma alíquota foi diluída em uma solução de TCA 50%/etanol P.A. 1:1 (v/v). A mensuração da fluorescência do corante azul de Evans foi realizada através de fluoroespectrofotometria (TECAN) em comprimento de onda de excitação de 620 nm e 680 nm de emissão. Para a determinação da concentração do corante nos hemisférios cerebrais foi utilizada uma curva padrão com diluições seriadas da solução estoque do corante (500 – 25 ng/ml). Os dados foram expressos em ng de azul de Evans/g de tecido cerebral.

### 3.6 Testes Comportamentais

#### 3.6.1 Avaliação neurológica

Após o período de 1 h e 1 - 4 semanas da indução do TCE, os camundongos foram submetidos ao Escore Neurológico de Severidade (ENS), o desempenho neste teste está relacionado com a severidade da lesão cerebral quando avaliado 1 h após o TCE em camundongos (STAHEL et al., 2000). O ENS consiste na avaliação de 10 parâmetros clínicos individuais (ver Tabela 4), consistindo em testes motores, estado de alerta e medidas fisiológicas, previamente descrito por (FLIERL et al., 2009) e padronizado recentemente em nosso laboratório (SCHWARZBOLD et al., 2010). Um ponto (01) é dado ao animal que apresente a ausência de comportamento ou a incapacidade de realizar alguma das tarefas, onde a pontuação máxima possível é de 10 pontos, indicando um maior comprometimento neurológico do animal.



**Figura 9.** Aparato utilizado para avaliação do Escore Neurológico de Severidade em camundongos.

**Tabela 4.** Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS)

Testes	Capacidade/Incapacidade
--------	-------------------------

Presença de paresia	0	1
Inabilidade em andar em linha reta	0	1
Perda do comportamento exploratório	0	1
Falha em sair do círculo (até 3 min)	0	1
Inabilidade em andar na trave de 3 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em andar na trave de 2 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em andar na trave de 1 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em se equilibrar na trave 0,7 cm (até 10 s)	0	1
Inabilidade em se equilibrar na trave redonda (até 10 s, 3 tentativas)	0	1
Perda do reflexo de sobressalto	0	1
Escore máximo		10

A gravidade do TCE em camundongos pode ser definida pelo ENS 1 h após o trauma (FLIERL et al., 2009). O trauma leve corresponde a um escore inferior a 4 pontos, o trauma moderado corresponde a um escore compreendido entre 5 – 8 pontos e o trauma grave um escore igual ou superior a 9 pontos. Portanto, a gravidade do TCE apresentada pelos animais no presente estudo foi moderada, e para que isso ocorresse, foi utilizado um projétil de 12,5 g, como padronizado recentemente em nosso grupo por Schwarzbald e colaboradores (2010).

### 3.6.2 *Teste do campo aberto*

Após o período de 1 e 4 semanas da indução do TCE e administração de 6-OHDA, a atividade locomotora espontânea de grupos independentes de animais foi avaliada no teste do campo aberto de acordo com a metodologia utilizada previamente em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2008). Os camundongos foram colocados no centro de uma arena de acrílico (50 x 50 cm, paredes transparentes, e piso cinza e iluminação de 12 lux), sendo que os animais podiam explorar livremente o aparato durante 5 min. Os experimentos foram filmados e a distancia total percorrida foi avaliada através da plataforma ANY-maze<sup>TM</sup>.

### 3.6.3 Rotarod

O sistema do rotarod (Rotamex-V-EE/85), controlado por sistema computacional (Columbus Instruments Computer-Counter Interface; Ohio, USA), foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e o equilíbrio dos camundongos antes (medida basal) e 1 - 4 semanas após a indução do TCE e/ou da administração de 6-OHDA. Utilizou-se a versão em aceleração do rotarod, onde os animais foram colocados sobre um cilindro em rotação, com velocidade inicial 5 rotações por minuto (RPM) e aceleração de 0,1 revolução/s, pelo período máximo de 60 s, sendo a latência para queda (em s) registrada numa única sessão de teste (SHIOTSUKI et al., 2010).

## 3.7 Desafios farmacológicos

### 3.7.1 Rotações induzidas por apomorfina

Os camundongos foram colocados em cilindros individuais (19 cm de diâmetro e 22 cm de altura) para registro do comportamento rotacional. Os animais foram habituados durante 10 min, e após a injeção de apomorfina (0.6 mg/kg, s.c.) registrou-se o comportamento rotacional durante 30 min. O número de rotações ipsilaterais e contralaterais ao hemisfério esquerdo lesionado com o TCE foram avaliadas através da plataforma ANY-maze<sup>TM</sup>.

Classicamente, esse modelo permite acompanhar a evolução da neurodegeneração em modelos de lesão unilateral com 6-OHDA uma vez que é observada uma deservação ipsilateral (lado lesado) pré-sináptica e hipersensibilidade pós-sináptica dos receptores dopaminérgicos, não sendo afetado o lado contralateral (lado intacto). Portanto, quando desafiados com agonistas ou fármacos que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica (ex.: apomorfina e anfetamina, respectivamente), os animais apresentam assimetria de orientação, ipsilateral (apomorfina) e contralateral (anfetamina), ao lado lesado, e sua frequência de rotação está diretamente relacionado com o grau da lesão (ALEXANDER; CRUTCHER; DELONG, 1990; SCHWARTING; HUSTON, 1996).

Diante do exposto acima, o teste da rotação induzida por apomorfina foi utilizado com o objetivo de verificar: (i) se a lesão ocasionada pelo TCE causaria um desequilíbrio progressivo na neurotransmissão dopaminérgica entre os dois hemisférios e (ii) se a possível lesão induzida pela administração i.p. pela 6-OHDA após o

TCE seria ipsilateral (lado submetido ao TCE) ou se afetaria igualmente os dois hemisférios cerebrais.

### *3.7.2 Efeitos da administração aguda de L-Dopa sobre as alterações motoras induzidas pelo traumatismo cranioencefálico e/ou 6-OHDA*

Os efeitos da administração aguda de L-Dopa sobre o desempenho motor de camundongos foi avaliado nos testes do campo aberto e do rotarod 4 semanas após a indução do TCE e da administração de 6-OHDA. Estes experimentos com a L-Dopa, o principal fármaco utilizado no tratamento da DP, foram realizados para avaliar se os possíveis prejuízos locomotores dos animais submetidos ao TCE e a administração i.p. de 6-OHDA estariam relacionados com a morte de neurônios dopaminérgicos (MEREDITH; KANG, 2006). Grupos independentes de animais foram avaliados nos aparatos (campo aberto ou rotarod) 30 min após a administração i.p. da associação de L-Dopa (25 mg/kg) e benserazida (12,5 mg/kg). Sendo que os testes comportamentais foram realizados como descrito anteriormente nos itens 3.6.2 e 3.6.3.

### *3.7.3 Catalepsia induzida por haloperidol*

O comportamento de catalepsia é mediado pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos (principalmente pelos receptores do tipo D<sub>2</sub>) estriatais (SANBERG, 1980; WEIHMULLER; HADJICONSTANTINOU; BRUNO, 1990). A postura cataléptica (permanência constante e involuntária do animal em uma posição anti-fisiológica) induzida por haloperidol foi avaliada 4 semanas após a administração de 6-OHDA. A postura cataléptica foi avaliada 30 min após a administração de haloperidol (0,5 mg/kg, i.p.), um antagonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, onde os membros anteriores dos camundongos foram apoiados sobre uma barra de vidro (3 mm de diâmetro, 4,5 cm de altura, 10 cm de largura) e os membros posteriores apoiados sobre o solo. A avaliação da postura cataléptica foi realizada com limite máximo de 180 s ou até que o animal saísse da postura cataléptica sendo que os animais foram submetidos a 3 tentativas consecutivas para permanecerem em postura cataléptica (WEIHMULLER; HADJICONSTANTINOU; BRUNO, 1990; OHNO et al., 2010).

### 3.7.4 Comportamento de escalada induzido por apomorfina

O comportamento de escalada (“*climbing*”) representa um comportamento estereotipado e foi mensurado para avaliarmos a sensibilidade dos receptores dopaminérgicos à apomorfina (um agonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>) 4 semanas após a administração de 6-OHDA. Os animais foram previamente habituados em gaiolas metálicas (2 mm de diâmetro, 1 cm de distância) durante 60 min, sendo então administrada a apomorfina (3 mg/kg, s.c.) e o comportamento de escalada foi mensurado a cada 5 min durante um período de 60 min (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comportamento de escalada induzido por apomorfina

Comportamento apresentado	Escore de estereotipia
4 patas no piso da gaiola	0
2 patas na grade da gaiola	1
4 patas na grade da gaiola (intermitente)	2
4 patas na grade da gaiola (constantemente)	3
Escore máximo	36

## 3.8 Avaliações bioquímicas

### 3.8.1 Imunodetecção de proteínas (Western Blot)

Os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical e seus cérebros foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada (4 °C). O estriado foi isolado e armazenado em freezer -80° C.

As amostras coletadas foram homogeneizadas em tampão de lise A gelado (HEPES 10 mM, pH 7,9), contendo: 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de NaF, 2 mM de Na<sub>3</sub>Vo<sub>4</sub>, 10 mM de β-glicerolfosfato, 1 mM de DTT, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina e 1 mM de PMSF, posteriormente incubadas em gelo por 15 min e logo após foram centrifugadas a 15.000 x g, por 60 min (4° C). O sobrenadante foi coletado como extrato citosólico. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (Bio-Rad Protein Assay Kit)



segundo recomendações do fabricante. Os extratos citosólicos foram armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Com o objetivo de verificar possíveis alterações na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH), 4 semanas após a administração de 6-OHDA, foi realizado o ensaio de imunodeteção de proteínas (*Western blot*). A fração citosólica, obtida como descrito anteriormente, foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida (12%), sendo logo depois transferida para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond<sup>TM</sup>-C Extra). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5 %) e posteriormente incubada com anticorpos primários contra TH (anticorpo policlonal de cabra, diluição 1:200) e  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e as bandas imunorreativas foram visualizadas através do uso de kit de aumento de quimiluminescência (Amersham ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents) e filme radiográfico (Amersham Hyperfilm ECL), segundo recomendações do fabricante. A densidade óptica das bandas foi quantificada utilizando a plataforma ImageJ (National Institute of Health, EUA).

### 3.9 Análise estatística

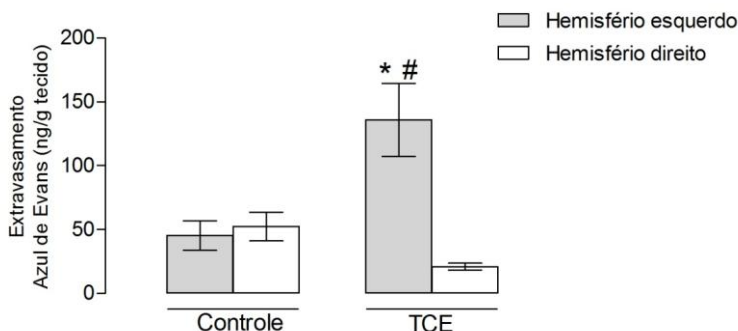
Os valores do extravasamento do corante azul de Evans usados para a avaliação da permeabilidade da BHE foram analisados utilizando-se o teste “t” de Student. Para a análise do escore neurológico de severidade, foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney U. Os resultados obtidos nos testes do campo aberto, rotarod, rotações induzidas por apomorfina e expressão da enzima TH foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias (com medidas repetidas quando adequado) sendo posteriormente utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls quando necessário. A análise estatística dos resultados obtidos nos testes da catalepsia induzida por haloperidol e do comportamento de escalada induzido por apomorfina foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Dunns. Para todos os testes utilizados, a probabilidade aceita como indicativo da existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foi de  $P < 0,05$ . Os resultados foram analisados pelo programa Statística® 7 (StatSoft

Inc., EUA) e as representações gráficas foram realizadas no programa GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE)

Na Figura 10 são apresentados os resultados dos efeitos do TCE sobre a permeabilidade da BHE em camundongos adultos. O teste *t* de *Student* não revelou diferenças significativas no extravasamento do corante azul de Evans entre os dois hemisférios do grupo controle [ $t(4) = 0,42$ ;  $P = 0,69$ ]. A análise estatística revelou que o hemisfério esquerdo do grupo TCE (ipsilateral à indução do TCE) apresentou um aumento na permeabilidade ao corante azul de Evans quando comparado tanto ao mesmo hemisfério do grupo controle [ $t(5) = 2,57$ ;  $P \leq 0,05$ ], quanto ao hemisfério contralateral (i.e., direito) do grupo TCE [ $t(6) = 4,01$ ;  $P \leq 0,05$ ].



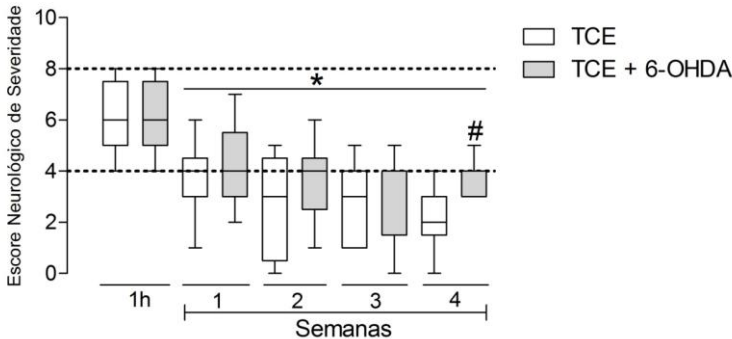
**Figura 10.** Efeito do traumatismo cranioencefálico (TCE) sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica em camundongos albinos adultos. As barras apresentam a concentração de azul de Evans extravasado (ng/g de tecido) 5 h após a indução do TCE (média  $\pm$  E.P.M.) ( $n = 3$  para o grupo controle e  $n = 4$  para o grupo TCE). \*  $P \leq 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle. #  $P \leq 0,05$  comparado ao hemisfério contralateral à lesão.

### 4.2 Escore neurológico de severidade (ENS)

Uma hora após a realização do TCE a taxa de mortalidade dos animais foi de 30%. Os animais sobreviventes foram submetidos ao ENS sendo então realizada a distribuição dos animais entre os grupos (TCE e TCE + 6-OHDA). Buscando uma maior uniformidade dos resultados, somente os animais que apresentaram um TCE moderado (isto é, valores de ENS compreendidos entre 5 e 8) foram incluídos no estudo, sendo que os animais que apresentaram TCE leve e grave foram

excluídos (aproximadamente 10% dos animais sobreviventes). As taxas de mortalidade após uma hora do TCE permanecem inalteradas.

Na Figura 11 é ilustrada a evolução do ENS após diferentes intervalos da indução do TCE e da administração de 6-OHDA. O teste de Mann Whitney revelou ausência de diferenças significativas entre os grupos TCE e TCE + 6-OHDA no período de 1 h a 3 semanas após a indução do TCE. Por outro lado, todos os grupos submetidos ao TCE (independente do tratamento com 6-OHDA) apresentaram diferença significativa em relação ao seu respectivo grupo controle ( $*P \leq 0,05$ ). De maneira interessante, o teste de Mann Whitney revelou um aumento significativo no ENS no grupo TCE + 6-OHDA em relação ao grupo TCE após 4 semanas da indução do TCE ( $\#P \leq 0,05$ , Figura 11).

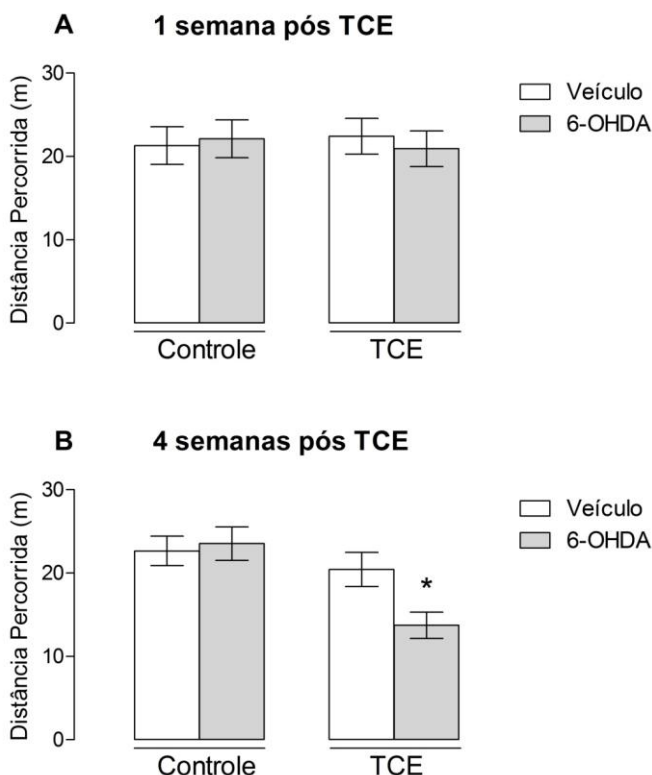


**Figura 11.** Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA (100 mg/kg) sobre o escore neurológico de severidade em camundongos albinos adultos. A medida foi realizada 1 h (animais que posteriormente receberão os respectivos tratamentos), 1 e 4 semanas após a indução do TCE. As barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. (n= 9 animais por grupo). \*  $P \leq 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (1h). #  $P \leq 0,05$  comparado ao grupo TCE da quarta semana (teste de Mann-Whitney U).

#### 4.3 Teste do campo aberto

Na Figura 12A são ilustrados os resultados da distância percorrida pelos camundongos no teste campo aberto 1 semana após a indução do TCE e da administração de 6-OHDA. A ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) revelou ausência de efeitos significantes para estes fatores isolados, ou para a sua interação

[ $F(1,30)=0,60$ ;  $P=0,60$ ]. Na figura 12B são ilustrados os resultados da distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto 4 semanas após a indução do TCE e da administração de 6-OHDA. A ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) revelou um efeito significativo do fator procedimento [ $F(1, 33)=10,42$ ;  $P\leq 0,05$ ] e da interação entre procedimento e tratamento [ $F(1, 33)=4,16$ ;  $P\leq 0,05$ ]. A análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou uma redução significativa na distância percorrida pelo grupo TCE + 6-OHDA em relação aos grupos controles após 4 semanas da indução do TCE.

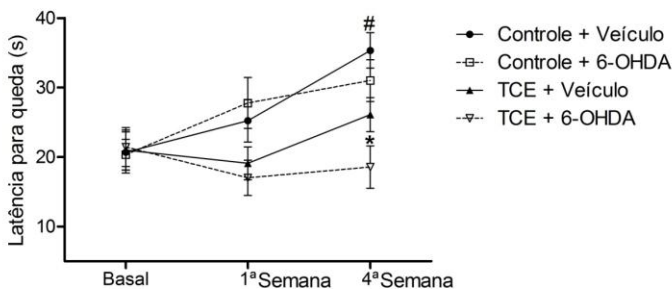


**Figura 12.** Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA (100 mg/kg) sobre a atividade locomotora de camundongos albinos adultos avaliada no teste do campo aberto (5 min). A análise foi realizada uma

(A) e quatro (B) semanas após a administração de 6-OHDA. Os dados são representados por média  $\pm$  E.P.M. (n= mínimo de 8 e 9 animais por grupo). \*  $P \leq 0,05$  comparado ao grupo controle (teste de Newman-Keuls).

#### 4.4 Teste do rotarod

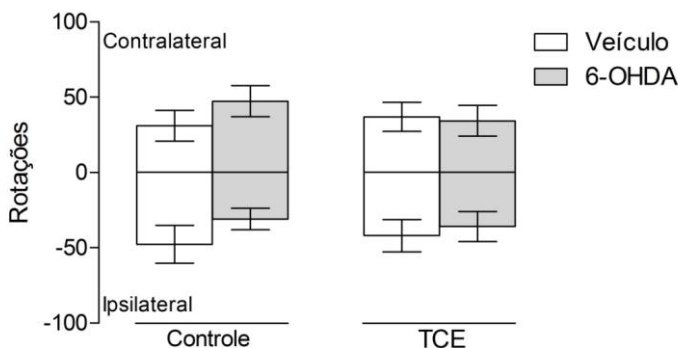
A ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) não revelou diferenças estatísticas para o desempenho basal dos animais dos diferentes grupos na tarefa do rotarod [ $F(1,33) = 0,02$ ,  $P = 0,88$ ]. Na primeira e quarta semana após a administração de 6-OHDA, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou diferenças significativas para o fator repetição [ $F(2,66) = 7,59$ ,  $P \leq 0,05$ ], para o fator procedimento [ $F(1,33) = 11,70$ ,  $P \leq 0,05$ ] e para a interação entre repetição e procedimento [ $F(2,66) = 5,35$ ,  $P \leq 0,05$ ] sobre a latência para a queda do rotarod. Comparações *post-hoc* de Newman-Keuls indicaram que na quarta semana após a administração de 6-OHDA o grupo controle + veículo apresentou um aumento na latência para a queda quando comparado com a sua medida basal, o que é sugestivo de um aprendizado motor. De maneira importante, o grupo TCE + 6-OHDA apresentou uma redução significativa na latência para a queda do rotarod quando comparado ao grupo controle + veículo na quarta semana (Figura 13).



**Figura 13.** Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA (100 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos albinos adultos avaliada no teste do rotarod antes da indução do traumatismo cranioencefálico (basal), e no período de 1 e 4 semanas após a administração de 6-OHDA. Os pontos que interconectam as linhas representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= mínimo de 9 animais por grupo). \*  $P \leq 0,05$  comparado ao grupo Controle da quarta semana. #  $P \leq 0,05$  comparado à medida basal do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

#### 4.5 Rotações induzidas por apomorfina

No teste das rotações induzidas por apomorfina, realizado quatro semanas após a administração de 6-OHDA, a ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) revelou ausência de diferenças significativas entre os grupos tanto no número de rotações contralaterais ao TCE [ $F(1,33)= 0,87, P=0,35$ ], quanto ipsilaterais ao TCE [ $F(1,33)= 0,26, P=0,60$ ], que podem ser observados na Figura 14.

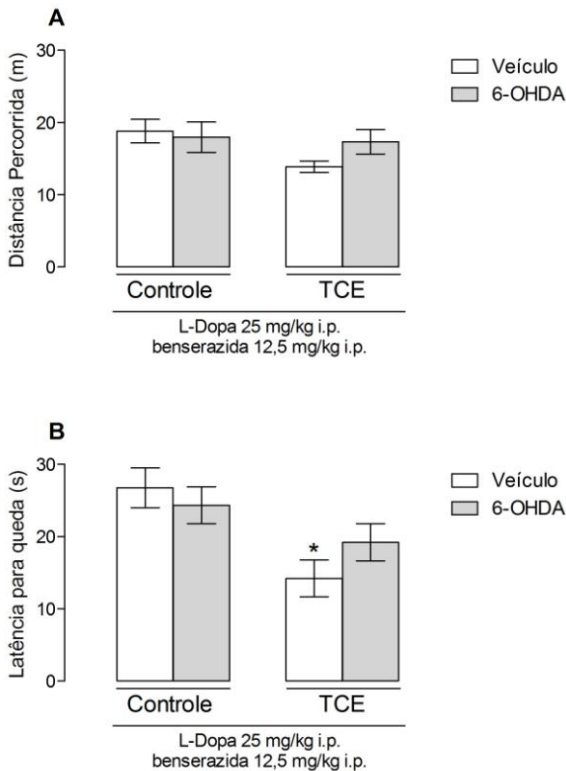


**Figura 14.** Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA (100 mg/kg) sobre as rotações induzidas por apomorfina em camundongos albinos adultos, quatro semanas após a administração de 6-OHDA. As barras representam o número de rotações ipsilaterais e contralaterais ao hemisfério esquerdo submetido ao TCE. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (n= mínimo de 9 animais por grupo).

#### 4.6 Efeitos da administração de L-Dopa sobre as alterações motoras induzidas pelo TCE e/ou administração de 6-OHDA

Na Figura 15 são apresentados os resultados da administração aguda de L-Dopa sobre o desempenho motor de camundongos avaliadas nos testes do campo aberto (figura 15 A) e do rotarod (Figura 15 B) 4 semanas após a indução do TCE e da administração de 6-OHDA. Os testes foram realizados 30 min após a administração i.p. da associação de L-Dopa (25 mg/kg) e benserazida (12,5 mg/kg). Na Figura 15A são ilustrados os resultados da distância percorrida pelos camundongos no teste campo aberto, onde a ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) não revelou diferença estatística entre os grupos [ $F(1,34)=$

1,67;  $P=0,20$ ]. No teste do rotarod, a ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) não revelou diferenças estatísticas para o desempenho basal dos animais [ $F(1,31)= 0,23$ ,  $P=0,63$ ] (resultados não mostrados). Na quarta semana após a administração de 6-OHDA, a ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o fator procedimento nos animais tratados com L-Dopa [ $F(1,31)= 2,01$ ,  $P\leq 0,05$ ]. Comparações *post-hoc* de Newman-Keuls indicam que na quarta semana o grupo TCE + 6-OHDA apresentou uma redução significativa na latência para queda do rotarod quando comparado ao seu grupo controle, sendo que o tratamento com L-Dopa foi capaz de reverter este prejuízo no grupo TCE + 6-OHDA (Figura 15B).

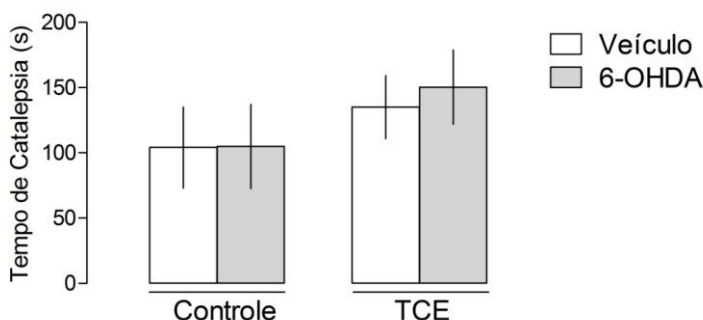




**Figura 15.** Efeitos da administração aguda de L-Dopa sobre os prejuízos motores induzidos pelo traumatismo cranioencefálico (TCE) e/ou a administração de 6-OHDA (100 mg/kg) em camundongos swiss adultos avaliados quatro após 4 semanas nos testes do campo aberto (figura 15A) e rotarod (figura 15B). Os animais de todos os grupos receberam a injeção intraperitoneal da associação L-Dopa + benserazida (25/12,5 mg/kg) 30 min antes da realização dos testes comportamentais. As figuras estão representadas por (média  $\pm$  E.P.M.). (n= mínimo de 8 animais por grupo). \*  $P \leq 0,05$  comparado ao grupo controle + veículo. (Teste de Newman-Keuls).

#### 4.7 Catalepsia induzida por haloperidol

Na Figura 16 são apresentados os resultados do teste da catalepsia induzida por haloperidol realizado 4 semanas após a administração de 6-OHDA ou veículo. A análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis revelou a ausência de diferenças significativas na duração do estado cataléptico entre os grupos.

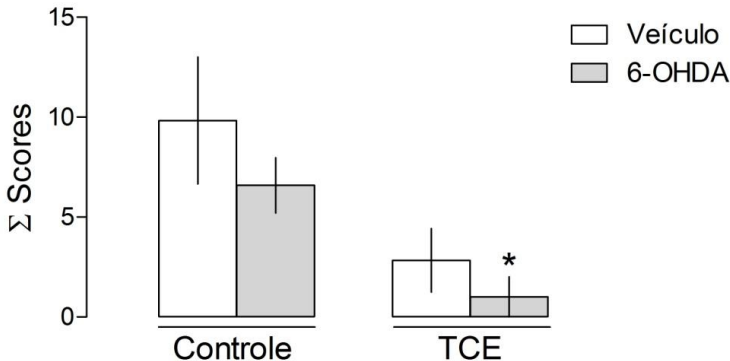


**Figura 16.** Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA (100 mg/kg) sobre o tempo de catalepsia induzida pela administração de haloperidol (0,5 mg/kg, i.p.) em camundongos albinos adultos avaliados quatro semanas após a administração de 6-OHDA. As barras representam o tempo de catalepsia, valores estão expressos em mediana e intervalo interquartil (n= mínimo de 8 animais por grupo).

#### 4.8 Comportamento de escalada induzido por apomorfina

Na Figura 17 estão expressos os resultados do comportamento de escalada induzido por apomorfina realizado 4 semanas após a administração de 6-OHDA ou veículo. O teste estatístico não-

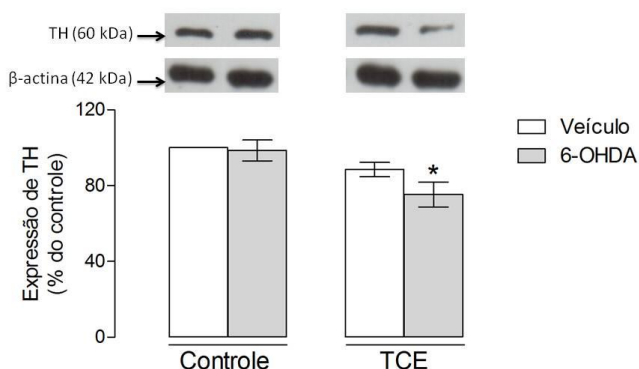
paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos nos escores do comportamento de escalada ( $P \leq 0,05$ ). O teste *post-hoc* de Dunns indicou diferenças entre o grupo TCE + 6-OHDA em relação ao grupo controle + veículo ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 17.** Efeitos do traumatismo cranioencefálico (TCE) e da administração de 6-OHDA (100 mg/kg) sobre o comportamento de escalada induzida pela administração de apomorfina (3 mg/kg, s.c.) em camundongos albinos adultos avaliado 4 semanas após a administração de 6-OHDA. As barras representam o somatório dos escores do comportamento de escalada, valores estão expressos em mediana e intervalo interquartil (n= 12 animais por grupo). \*  $P \leq 0,05$  em relação ao grupo controle + veículo (Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Dunns)

#### 4.9 Imunodeteção de proteínas (Western Blot)

Na figura 18 são expressos os resultados da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado ipsilateral (esquerdo) ao trauma dos animais 4 semanas após a administração de 6-OHDA ou veículo. A ANOVA de duas vias (procedimento x tratamento) revelou um efeito significativo do fator procedimento [ $F(1, 12)=10,42$ ;  $P \leq 0,05$ ]. A análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou uma redução significativa (aproximadamente 30%) na expressão de TH do grupo TCE + 6-OHDA em relação ao grupo controle.



**Figura 18.** Efeito do traumatismo cranioencefálico sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase no estriado ipsilateral (esquerdo) ao trauma de camundongos albinos adultos 4 semanas após administração de 6-OHDA (100 mg/kg). A barra do grupo controle estão representados 100% dos resultados do grupo e os demais grupos, os resultados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. ( $n=4$  animais por grupo). \*  $P \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que o TCE moderado aumentou a sensibilidade de camundongos adultos às alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração i.p. de 6-OHDA, uma toxina que em condições normais é incapaz de atravessar a BHE.

O modelo de TCE utilizado neste estudo foi o de queda livre de peso, sendo este um dos quatro modelos animais mais empregados na investigação do TCE, juntamente com os modelos de aceleração por impacto, percussão por fluido e impacto cortical controlado (MORALES et al., 2005).

No modelo da aceleração por impacto, um projétil em queda livre também é utilizado, entretanto, o crânio é protegido por uma placa de metal e o animal é posicionado sobre uma plataforma coberta de espuma, permitindo o movimento da cabeça após o impacto, privilegiando a ocorrência de dano por forças inerciais (MORALES et al., 2005). O modelo de impacto cortical controlado (ICC) e o da percussão por fluido envolvem a trepanação craniana. O ICC utiliza ar comprimido para gerar energia a um pistão que é impulsionado contra a dura-máter exposta do animal. Este modelo tem como vantagem a facilidade de controlar a gravidade do trauma (O'CONNOR; SMYTH; GILCHRIST, 2011). Já no modelo de percussão por fluido, um pendulo determina a força da pressão do fluido (salina) que é pulsado contra o córtex (MORGANTI-KOSSMANN; YAN; BYE, 2010).

Estes modelos representam ferramentas importantes para a investigação e compreensão dos mecanismos da lesão primária e secundária, além de serem empregados para investigar as alterações comportamentais complexas que ocorrem após o TCE em roedores (FUJIMOTO et al., 2004; SCHWARZBOLD et al., 2010).

Segundo Flierl, o modelo que mais se aproxima da condição clínica é o da queda de peso, sem craniotomia (sendo este selecionado para o presente estudo). Este modelo consiste na utilização da força gravitacional de uma queda livre de peso. A gravidade da lesão é controlada através do ajuste da altura e da massa do peso a ser utilizado, representando uma técnica rápida e fácil (FLIERL et al., 2009). É importante salientar que um único modelo animal não é capaz de mimetizar completamente o TCE humano (isto é, apresentando validade de face, de construto, e preditiva), devido à variação e complexidade deste fenômeno em humanos (O'CONNOR; SMYTH; GILCHRIST, 2011). Dados epidemiológicos recentes têm mostrado que 85 – 89% dos

casos de TCE ocorrem em pacientes que sofreram lesões secundárias ao trauma decorrentes de acidente de trânsito ou quedas (FLIERL et al., 2009). Assim, um impacto mecânico sobre o crânio replicaria melhor as características de um trauma com estas características, como por exemplo, uma queda, um acidente de carro ou moto, quando comparado com a simples exposição da dura-máter, utilizada em outros modelos de TCE (FLIERL et al., 2009).

No presente estudo foi demonstrado que o TCE moderado possui uma característica muito importante que é o de aumentar a permeabilidade da BHE, e que por meio deste mecanismo é possível a ação da 6-OHDA no SNC de roedores mesmo após a sua administração sistêmica. O aumento na permeabilidade da BHE observado 5 h após a indução do TCE está de acordo com relatos prévios em roedores, aonde foi verificado que o pico máximo da permeabilidade da BHE ocorre entre 4 – 6 h após o TCE (CHEN et al., 1996; STAHEL et al., 2000). Além disso, achados clínicos indicam que a permeabilidade da BHE das vítimas de TCE é restabelecida dias ou semanas após o trauma (SHLOSBERG et al., 2010), enquanto outros autores relatam que a permeabilidade da BHE pode permanecer alterada por meses ou até mesmo anos em consequência do trauma (TOMKINS et al., 2011). No entanto, permanece desconhecido se o aumento na permeabilidade da BHE está relacionado com a lesão primária ou aos processos patológicos da lesão secundária após o TCE (SHLOSBERG et al., 2010).

Baskaya e colaboradores (1997) observaram um fenômeno que intitularam de abertura bifásica da BHE em ratos submetidos ao TCE. Este fenômeno consiste em dois períodos de maior permeabilidade da BHE verificados 4 – 6 h e 3 dias após a indução do TCE (BASKAYA et al., 1997). Em outro estudo, Shapira e colaboradores utilizaram a queda livre de peso e demonstraram que a permeabilidade máxima da BHE ocorria 4 h após o TCE, com posterior declínio da concentração de azul de Evans no SNC, sendo que após o quarto dia não era mais encontrado diferença na permeabilidade a este corante em comparação ao grupo controle (SHAPIRA et al., 1993).

O mecanismo pelo qual ocorre a abertura da BHE permanece no campo especulativo mesmo em modelos animais (CHODOBSKI; ZINK; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, 2011). Em uma visão molecular do que estaria ocorrendo podemos destacar o comprometimento do fluxo sanguíneo, uma vez que é essencial para o aporte energético e oxigenação cerebral que este fluxo seja constante (LUSARDI, 2009). O

edema é uma consequência comum após o TCE, resultando na compressão dos ventrículos e vasoconstricção, sendo que estes eventos podem levar a importantes co-morbidades observadas após o TCE, que são a hipóxia e a isquemia (LUSARDI, 2009). Estes quadros de disfunção do fluxo sanguíneo e co-morbidades após o TCE podem levar a alterações na morfologia dos vasos, além de inflamação, ruptura da BHE, e alterações no metabolismo do óxido nítrico e acetilcolina (DIXON et al., 1995; SHLOSBERG et al., 2010). Além disso, quadros isquêmicos podem ocasionar um súbito aumento dos níveis extracelulares de glutamato, causando excitotoxicidade (CHOI; ROTHMAN, 1990; BENVENISTE, 2009; LUSARDI, 2009). O processo de excitotoxicidade após o TCE pode perdurar durante minutos ou dias após o TCE (OBRENOVITCH; URENJAK, 1997) e levar à ativação de vias apoptóticas, e por fim, a morte celular. Os mecanismos responsáveis pelo aumento de glutamato são variados, incluindo o processo de mecanoporação, facilitação de sua entrada devido à ruptura da BHE, alteração astrocitária e neurotransmissão anômala, resultando em excessivos processos de excitotoxicidade (YI; HAZELL, 2006).

Além disso, acredita-se que nos processos secundários ao TCE o estresse oxidativo e a neuroinflamação sejam os maiores responsáveis pela morte celular. O papel de cada um destes eventos secundários permanece controverso, pois estes parecem interagir sinergicamente, resultando em morte neuronal. Por exemplo, a enzima ciclooxigenase também pode induzir a formação de radicais livres; outro exemplo é que o processo de excitotoxicidade glutamatérgica pode induzir a expressão de ciclooxigenases do tipo 2 (COX-2), esta, por sua vez, pode exacerbar a lesão isquêmica, além de contribuir para o estresse oxidativo (TYURIN et al., 2000). Todos estes fenômenos acabam gerando uma reação em cadeia, comprometendo a integridade da BHE (SHLOSBERG et al., 2010).

É importante ser destacado que a 6-OHDA já foi utilizada previamente como ferramenta para a investigação da disfunção da BHE. Essa neurotoxina foi utilizada para avaliar o tempo de formação da BHE pós-natal em ratos, além de várias outras medidas periféricas como vasoconstricção e medidas comportamentais como a locomoção (CLARK; LAVERTY; PHELAN, 1972). Neste estudo pioneiro, os níveis cerebrais de monoaminas foram mensurados após a administração de 100 mg/kg (i.p.) de 6-OHDA, e foi demonstrado que a completa formação da BHE pode se estender até o 14º dia pós-natal em ratos, e que doses de 6-OHDA acima de 150 mg/kg induzem uma elevada

mortalidade nos animais devido ao comprometimento do sistema nervoso simpático (CLARK; LAVERTY; PHELAN, 1972; KOSTRZEWA, 2007). Com base nos achados deste trabalho utilizamos a dose de 100 mg/kg de 6-OHDA em nossa investigação.

No presente estudo, o TCE associado à administração de 6-OHDA causou um comprometimento motor dos animais quando avaliados nos testes do campo aberto e rotarod, além inibir a recuperação espontânea das funções neurológicas gerais avaliadas no teste do ENS. O comprometimento motor observado na quarta semana no grupo TCE + 6-OHDA foi a primeira evidência de que a 6-OHDA, mesmo quando administrada pela via i.p., poderia estar atuando na via dopaminérgica nigroestriatal, semelhante ao observado após a administração central desta toxina (MEREDITH; KANG, 2006).

O ENS foi inicialmente descrito por Beni-Adani e colaboradores (2001). Este teste é composto por 10 tarefas individuais que testam a função motora, agilidade e comportamentos fisiológicos, e cada erro está diretamente relacionado com o comprometimento do estado neurológico (ver Tabela 4) (BENI-ADANI et al., 2001). Esta alta correlação com a gravidade da lesão cerebral foi determinada por ressonância magnética em estudos *in vivo* e histológicos em camundongos (BENI-ADANI et al., 2001). No presente estudo, os animais apresentaram comprometimento neurológico por até 24 h após a indução do TCE, seguido por uma recuperação parcial espontânea, fenômeno já relatado em trabalhos prévios da literatura (FLIERL et al., 2009). A recuperação espontânea vem sendo explorada na literatura no contexto de que substâncias neuroprotetoras possam ser utilizadas após o TCE para auxiliarem na recuperação neurológica destes animais (MIKAWA et al., 1996; LEINHASE et al., 2007).

Contudo, observamos no presente estudo que os animais de ambos os grupos TCE e TCE + 6-OHDA apresentaram o mesmo perfil de curva de recuperação espontânea no ENS, no entanto a recuperação espontânea no grupo TCE + 6-OHDA foi menor. Podemos especular que o processo de recuperação espontânea é mais lento nos animais submetido ao TCE que receberam a injeção i.p. de 6-OHDA e, conseqüentemente, estes animais apresentam prejuízos motores e neurológicos evidentes na quarta semana após a indução do trauma. Neste sentido, o nosso estudo é o primeiro a demonstrar que, decorridas 4 semanas do trauma, os animais submetidos ao trauma que receberam 6-OHDA pela via i.p. apresentam um prejuízo na avaliação do ENS quando comparados com o grupo controle. Dados ainda não publicados

do nosso grupo (Matheus e colaboradores) já evidenciaram que camundongos C57BL/6 com 15 meses de idade apresentam um prejuízo no desempenho no ENS quando comparado ao grupo controle 13 dias após receberem a administração intranasal da neurotoxina MPTP, um modelo experimental da DP desenvolvido em nosso laboratório. Diante disso, o ENS parece representar um teste eficiente para detectar as alterações comportamentais causadas por neurotoxinas, uma vez que alguns trabalhos relatam que o ENS não é capaz de detectar mudanças sutis no desempenho, que são atribuídas às mudanças morfológicas geradas por danos nos tecidos cerebrais (LEINHASE et al., 2007).

A hiperlocomação pós-traumática é um sintoma comum entre os pacientes que sofreram TCE, no entanto, estudos abordando esta anormalidade são escassos e o mecanismo pelo qual este sintoma ocorre ainda não foi esclarecido (LI et al., 2006). A hiperlocomação pós TCE também é relatada em modelos animais (SCHWARZBOLD et al., 2010), e assim como na pesquisa clínica, o mecanismo pelo qual ocorre este fenômeno permanece desconhecido também na área pré-clínica. O aumento na locomoção pós TCE, segundo Li e colaboradores, é o reflexo de prejuízos de memórias de trabalho e espacial, que levam a uma dificuldade na formação de um mapa espacial e, por consequência, não ocorre o fenômeno de habituação frente à exploração de um novo ambiente (como o campo aberto) (LI et al., 2006). Todavia, deve ser destacado que este aumento na locomoção pós TCE observado em modelos animais está relacionado com a gravidade do trauma, sendo que somente animais submetidos ao TCE grave apresentam esse tipo de resposta (VIGGIANO, 2008; SCHWARZBOLD et al., 2010). Portanto, não seria esperado que os animais submetidos ao TCE moderado apresentassem comprometimento motor no presente estudo.

Os sintomas motores, como já descritos anteriormente, tornam-se evidentes na DP em pacientes que já se encontram num estágio mais avançado (a partir do estágio 4 segundo a classificação de Braak et al., 2003) (PREDIGER et al., 2011). Embora os modelos animais da DP em roedores devam reproduzir as características clínicas (como os sintomas motores), tem sido observado que a deficiência motora em roedores é mais sutil, sendo que os níveis de dopamina devem atingir um limiar de redução para que os prejuízos motores se tornem perceptíveis (BENINGER, 1983).

A lesão nigroestriatal causada pela infusão local de 6-OHDA vem sendo amplamente utilizada para o estudo DP, apresentando baixo custo e elevada segurança de manipulação (BLANDINI et al., 2007). De



maneira importante, o pico de neurodegeneração dopaminérgico observado após a infusão da 6-OHDA costuma ser de 4 semanas (BLANDINI et al., 2007), o mesmo período selecionado no presente estudo para avaliação da performance motora e redução da expressão estriatal de TH.

A atividade locomotora é um dos principais parâmetros utilizados para se avaliar indiretamente a neurodegeneração induzida pela 6-OHDA na via nigroestriatal. No entanto, estas alterações motoras nem sempre são perceptíveis e dependem amplamente da dose e do local de administração da 6-OHDA, bem como do teste comportamental utilizado (MEREDITH; KANG, 2006).

O comprometimento motor induzido pela 6-OHDA parece ser mais facilmente detectado no rotarod do que no campo aberto (MEREDITH; KANG, 2006). Por outro lado, os resultados obtidos no teste do rotarod não consistem em uma análise direta da função dos gânglios basais, uma vez que o seu desempenho depende da integridade de diversos sistemas de neurotransmissão em diferentes áreas do SNC (MEREDITH; KANG, 2006). Além disso, trabalhos prévios observaram prejuízos locomotores induzidos pela 6-OHDA também no teste do campo aberto, entretanto estes prejuízos estão diretamente relacionados com a extensão da lesão induzida pela 6-OHDA, sendo que estes somente são observados após uma maciça neurodegeneração da via nigroestriatal (BENINGER, 1983; FERRO et al., 2005).

Na primeira semana após a indução do TCE e a administração de 6-OHDA, não observamos diferenças significativas no teste do campo aberto, rotarod e ENS em nenhum dos grupos experimentais. Estes dados estão de acordo com outros trabalhos (FUJIMOTO et al., 2004; SCHWARZBOLD et al., 2010), nos quais o TCE moderado, semelhante ao utilizado no presente estudo, não é capaz de induzir *per se* prejuízos locomotores em roedores uma semana após sua indução. Esta ausência de comprometimento motor tem sido associada ao processo de recuperação espontânea, além do fato do TCE moderado não ser capaz de causar comprometimento locomotor em longo prazo (FUJIMOTO et al., 2004; YU et al., 2012). Podemos também supor que uma semana é um período muito curto para a 6-OHDA administrada pela via i.p. causar uma degeneração significativa da via nigroestriatal em animais submetidos ao TCE, a exemplo do que é observado quando esta toxina é administrada diretamente no SNC de roedores (BLANDINI et al., 2007; BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).

Na quarta semana após a administração de 6-OHDA, o grupo TCE + 6-OHDA apresentou prejuízo locomotor quando comparado ao grupo controle. Estes resultados (juntamente com os resultados do ENS) são indicativos de que a 6-OHDA atravessou a BHE, promovendo estes déficits locomotores. Este conjunto de resultados nos leva a propor duas hipóteses relacionadas aos prejuízos locomotores: (i) a 6-OHDA *per se* foi capaz de ocasionar uma expressiva morte de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, levando a estes prejuízos (o que parece não acontecer visto que observamos uma redução de aproximadamente 30% na expressão estriatal da enzima TH); ou (ii) o TCE atinge áreas corticais que estão diretamente relacionadas com os gânglios da base que formam o sistema motor, essa primeira aferência de neurotransmissão afetada estaria associada com uma neurodegeneração ocasionada pela 6-OHDA e resultaria no comprometimento motor observado no campo aberto, rotarod e ENS. Deve ser destacado que em exames *post mortem* no tecido cerebral de portadores da DP, também são observados déficits no sistema não dopaminérgico estriatal (HUOT; LEVESQUE; PARENT, 2007).

Por outro lado, a rotação induzida por apomorfina, um agonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos, representa um dos testes comportamentais mais amplamente usado para a avaliação do hemiparkinsonismo induzido por uma administração unilateral de 6-OHDA (MEREDITH; KANG, 2006). No presente estudo realizamos este teste com o objetivo de avaliar se a lesão induzida pela administração i.p. de 6-OHDA em camundongos previamente submetidos ao TCE foi unilateral (somente no hemisfério esquerdo submetido ao TCE) ou se afetou os dois hemisférios, tendo em vista que a permeabilidade da BHE é significativamente maior no lado ipsilateral ao TCE (Figura 10).

De acordo com Wagner e colaboradores, o TCE *per se*, 10 dias após sua indução, não é capaz de induzir o comportamento de rotação em roedores (WAGNER et al., 2005). Este comportamento ocorre em animais lesados unilateralmente pela infusão de 6-OHDA devido ao aumento da sensibilidade dos receptores de dopamina no estriado, e isso ocorre após a redução dos níveis de dopamina acarretados pela morte de neurônios nigroestriatais. O comportamento de rotação acontece quando um agonista dopaminérgico, como a apomorfina, produz rotações contralaterais à lesão, pois estes receptores apresentam maior sensibilidade ao agonista em comparação ao outro hemisfério (SCHWARTING; HUSTON, 1996). Neste caso, o comportamento de

rotação ocorre apenas se existir uma redução em 90% nos níveis de dopamina no estriado, sendo que este fenômeno não é observado em animais lesados bilateralmente (HUDSON et al., 1993). O comportamento de rotação induzido por apomorfina não foi observado neste estudo, portanto, podemos supor que a ausência desse comportamento foi resultante de uma lesão bilateral nos animais, ou a lesão ocasionada pela 6-OHDA não foi capaz de causar uma redução expressiva nos níveis de dopamina no estriado, o que é reforçado pela redução parcial da expressão da enzima TH.

Os prejuízos locomotores observados no grupo TCE + 6-OHDA nos testes do campo aberto e do rotarod foram revertidos pela administração aguda da L-Dopa. A L-Dopa é amplamente utilizada para o diagnóstico clínico da DP, sendo que na maioria dos casos os pacientes apresentam boa resposta ao medicamento, assim como dos clássicos sintomas motores, história familiar de DP, testes olfatório e de neuroimagem, entre outros, também são utilizados para fins de diagnóstico da DP (TOLOSA; WENNING; POEWE, 2006). Em modelos animais da DP, a L-Dopa também é capaz de reverter os prejuízos locomotores induzidos por neurotoxinas capazes de degenerarem neurônios na via nigroestriatal (HARDEN; GRACE, 1995; VIARO; MARTI; MORARI, 2010), sendo que esta reversão dos prejuízos motores pela L-Dopa no presente estudo, confirmam que a administração sistêmica de 6-OHDA foi capaz de induzir um comprometimento dos neurônios dopaminérgicos nos animais previamente submetidos ao TCE. É importante ser destacado que este conjunto de resultados reforça que o TCE associado à administração i.p. de 6-OHDA foi capaz de induzir Parkinsonismo nos animais, uma vez que eles apresentaram várias características semelhantes às aquelas observadas em pacientes com a DP, tais como: (i) neurodegeneração dopaminérgica da via nigroestriatal; (ii) prejuízos motores; e (iii) boa resposta farmacológica a L-Dopa.

Outros achados que reforçam a presença de Parkinsonismo nos animais deste estudo foram às alterações observadas no teste do comportamento de escalada (“climbing”) induzido por apomorfina, além da redução significativa dos níveis de TH dos animais TCE+6-OHDA. Os desafios farmacológicos no teste da catalepsia e de comportamento de escalada tiveram o objetivo de testar a funcionalidade e sensibilidade dos receptores dopaminérgicos da via nigroestriatal, enquanto a mensuração dos níveis de TH teve o objetivo de confirmar a

neurodegeneração induzida pela 6-OHDA, através de uma análise molecular.

Alterações no sistema dopaminérgico já foram relatadas após o TCE em animais de laboratório (BALES et al., 2009). Por exemplo, o TCE pode induzir a perda dos neurônios nigroestriatais, sendo que esta redução, após 26 semanas, pode chegar a 30%, semelhante à redução da expressão de TH observada no presente estudo (HICKS et al., 1996; HUTSON et al., 2010). Além disso, foi observado que o TCE promove uma redução nos níveis estriatais do DAT, sem, todavia, alterar a expressão do receptor dopaminérgico do tipo D<sub>2</sub> (WAGNER et al., 2005).

O comportamento de escalada e de catalepsia induzidos, respectivamente, por apomorfina e haloperidol, são testes farmacológicos clássicos que estão diretamente relacionados com a funcionalidade dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (FETSKO; XU; WANG, 2003). O receptor dopaminérgico do tipo D<sub>2</sub> apresenta duas isoformas: D<sub>2</sub> forma curta (D<sub>2</sub>S) e D<sub>2</sub> forma longa (D<sub>2</sub>L), sendo que estas isoformas apresentam diferentes funcionalidades (USIELLO et al., 2000). A forma D<sub>2</sub>S é principalmente um auto-receptor pré-sináptico inibitório, sendo que acaba modulando negativamente as respostas pós-sinápticas dependentes do receptor D<sub>1</sub>, já a forma D<sub>2</sub>L é exclusivamente pós-sináptica, sendo que seus efeitos acabam agindo de forma sinérgica com os receptores D<sub>1</sub>, no estriado (USIELLO et al., 2000; FETSKO; XU; WANG, 2003). De maneira geral, na pré-sinapse ocorre a expressão do receptor D<sub>2</sub>S e DAT e na pós-sinapse a expressão dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>L, predominantemente.

O haloperidol possui maior seletividade para receptores do tipo D<sub>2</sub> para dopamina, no entanto ele age somente na isoforma D<sub>2</sub>L, já a apomorfina é um agonista não-seletivo dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> de dopamina, com uma pequena preferência para a isoforma D<sub>2</sub>S (USIELLO et al., 2000; FETSKO; XU; WANG, 2003). No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no comportamento de catalepsia induzida por haloperidol. Levando em consideração que o haloperidol age sobre a isoforma D<sub>2</sub>L, seria esperado que não houvesse diferença neste comportamento, pois o TCE *per se* não apresenta redução na expressão dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> e a 6-OHDA tem seu mecanismo de ação em neurônios pré-sinápticos que não expressam a isoforma D<sub>2</sub>L.

No comportamento de escalada induzido por apomorfina, observamos uma redução significativa deste comportamento no grupo

TCE + 6-OHDA. Podemos supor que este comportamento esteja afetado devido a uma degeneração pré-sináptica induzida pela 6-OHDA e, consequentemente, por uma redução nos níveis da isoforma D<sub>2</sub>S. Em acordo com esta hipótese, Fetsko e colaboradores (2003) demonstraram que o comportamento de escalada induzido por apomorfina era substancialmente aumentado em animais nocaute para isoforma D<sub>2</sub>L, sugerindo que este comportamento está mais intimamente correlacionado com a interação dos receptores D<sub>2</sub>S e D<sub>1</sub>, mas o mecanismo exato pelo qual esta interação ocorre ainda não está elucidado (FETSKO; XU; WANG, 2003). Alternativamente, podemos supor que a redução no comportamento de escalada estaria relacionada com o prejuízo motor apresentado pelo grupo TCE + 6-OHDA.

As reduções dos níveis de TH no estriado corroboraram com todos os resultados apresentados até o momento, além de indicarem que a 6-OHDA foi capaz de induzir perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. A marcação de TH (a enzima limitante na síntese de dopamina) vem sendo amplamente utilizada como marcação de morte neuronal da via nigroestriatal induzida por neurotoxinas como o MPTP e a 6-OHDA (PREDIGER et al., 2011). É importante assumirmos neste momento que a ausência de uma avaliação da expressão da enzima TH, bem como dos níveis de monoaminas, separadamente em cada um dos hemisférios representa uma importante limitação do presente estudo, sendo que estes experimentos já se encontram em andamento em nosso laboratório.

Nossos resultados estão de acordo com a hipótese de danos múltiplos na DP descrita por Sulzer (2007), uma vez que o TCE (primeiro dano) foi capaz de sensibilizar os neurônios dopaminérgicos para a ação da 6-OHDA (segundo dano), que está diretamente relacionada com a ruptura da BHE induzida pelo TCE (SULZER, 2007). Os resultados do presente estudo instigam a realização de estudos adicionais buscando avaliar possíveis estratégias neuroprotetoras após o TCE para que não ocorra esta vulnerabilidade neuronal.

## **6 CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo sugerem que o TCE associado a uma subsequente exposição sistêmica à neurotoxina 6-OHDA causou neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos e alterações comportamentais em camundongos. Estas observações sugerem que uma maior atenção e ampla divulgação devam ser dadas para o desenvolvimento da DP após o TCE, e que epidemiologicamente esse fator de risco deve ser levado em consideração.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, GE; CRUTCHER, MD; DELONG, MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. **Prog Brain Res**, v.85, p.119-46. 1990.

ALEXANDER, GE; DELONG, MR; STRICK, PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annu Rev Neurosci**, v.9, p.357-81. 1986.

BALES, JW; WAGNER, AK; KLINE, AE; DIXON, CE. Persistent cognitive dysfunction after traumatic brain injury: A dopamine hypothesis. **Neurosci Biobehav Rev**, v.33, n.7, p.981-1003. 2009.

BARBEE, KA. Mechanical cell injury. **Ann N Y Acad Sci**, v.1066, p.67-84. 2005.

BASKAYA, MK; RAO, AM; DOGAN, A; DONALDSON, D; DEMPSEY, RJ. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. **Neurosci Lett**, v.226, n.1, p.33-6. 1997.

BENI-ADANI, L; GOZES, I; COHEN, Y; ASSAF, Y; STEINGART, RA; BRENNEMAN, DE; EIZENBERG, O; TREMBOLVER, V; SHOHAMI, E. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.296, n.1, p.57-63. 2001.

BENINGER, RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. **Brain Res**, v.287, n.2, p.173-96. 1983.

BENVENISTE, H. Glutamate, microdialysis, and cerebral ischemia: lost in translation? **Anesthesiology**, v.110, n.2, p.422-5. 2009.

BHIDAYASIRI, R; TRUONG, DD. Therapeutic strategies for nonmotor symptoms in early Parkinson's disease: the case for a higher

priority and stronger evidence. **Parkinsonism & Related Disorders**, v.18, Supplement 1, n.0, p.S110-S113. 2012.

BLANDINI, F; ARMENTERO, MT; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat Disord**, v.14 Suppl 2, p.S124-9. 2008.

BLANDINI, F; LEVANDIS, G; BAZZINI, E; NAPPI, G; ARMENTERO, MT. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. **Eur J Neurosci**, v.25, n.2, p.397-405. 2007.

BLANDINI, F; NAPPI, G; TASSORELLI, C; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v.62, n.1, p.63-88. 2000.

BRAAK, H; RUB, U; GAI, WP; DEL TREDICI, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **J Neural Transm**, v.110, n.5, p.517-36. 2003.

CARLSSON, A. NOBEL LECTURE: A Half-Century of Neurotransmitter Research: Impact on Neurology and Psychiatry. **Bioscience Reports**, v.21, n.6, p.691-710. 2001.

CARROLL, LJ; CASSIDY, JD; PELOSO, PM; BORG, J; VON HOLST, H; HOLM, L; PANIAK, C; PEPIN, M. Prognosis for mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. **J Rehabil Med**, n.43 Suppl, p.84-105. 2004.

CHAUDHURI, KR; HEALY, DG; SCHAPIRA, AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v.5, n.3, p.235-45. 2006.

CHEN, X; GHRIPI, O; GEIGER, JD. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Alzheimers Dis**, v.20 Suppl 1, p.S127-41. 2010.



CHEN, Y; CONSTANTINI, S; TREMBOVLER, V; WEINSTOCK, M; SHOHAMI, E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. **J Neurotrauma**, v.13, n.10, p.557-68. 1996.

CHESSELET, MF; RICHTER, F. Modelling of Parkinson's disease in mice. **Lancet Neurol**, v.10, n.12, p.1108-18. 2011.

CHODOBSKI, A; ZINK, BJ; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. **Transl Stroke Res**, v.2, n.4, p.492-516. 2011.

CHOI, DW; ROTHMAN, SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu Rev Neurosci**, v.13, p.171-82. 1990.

CLARK, DW; LAVERTY, R; PHELAN, EL. Long-lasting peripheral and central effects of 6-hydroxydopamine in rats. **Br J Pharmacol**, v.44, n.2, p.233-43. 1972.

CLARKE, CE. Dopamine agonist monotherapy in early Parkinson's disease. **Hosp Med**, v.64, n.1, p.8-11. 2003.

COLLIER, TJ; KANAAN, NM; KORDOWER, JH. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nat Rev Neurosci**, v.12, n.6, p.359-366. 2011.

CORRIGAN, JD; SELASSIE, AW; ORMAN, JA. The epidemiology of traumatic brain injury. **J Head Trauma Rehabil**, v.25, n.2, p.72-80. 2010.

DAY, HE; VITTOZ, NM; OATES, MM; BADIANI, A; WATSON, SJ, JR.; ROBINSON, TE; AKIL, H. A 6-hydroxydopamine lesion of the mesostriatal dopamine system decreases the expression of corticotropin releasing hormone and neurotensin mRNAs in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res**, v.945, n.2, p.151-9. 2002.

DE LA FUENTE-FERNANDEZ, R; SCHULZER, M; KURAMOTO, L; CRAGG, J; RAMACHANDIRAN, N; AU, WL; MAK, E; MCKENZIE, J; MCCORMICK, S; SOSSI, V; RUTH, TJ; LEE, CS; CALNE, DB; STOESSL, AJ. Age-specific progression of nigrostriatal dysfunction in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.69, n.5, p.803-10. 2011.

DE LAU, LM; BRETELER, MM. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v.5, n.6, p.525-35. 2006.

DI MONTE, DA; LAVASANI, M; MANNING-BOG, AB. Environmental factors in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v.23, n.4-5, p.487-502. 2002.

DIXON, CE; LIU, SJ; JENKINS, LW; BHATTACHARGEE, M; WHITSON, JS; YANG, K; HAYES, RL. Time course of increased vulnerability of cholinergic neurotransmission following traumatic brain injury in the rat. **Behav Brain Res**, v.70, n.2, p.125-31. 1995.

DONNEMILLER, E; BRENNEIS, C; WISSEL, J; SCHERFLER, C; POEWE, W; RICCABONA, G; WENNING, GK. Impaired dopaminergic neurotransmission in patients with traumatic brain injury: a SPECT study using 123I-beta-CIT and 123I-IBZM. **Eur J Nucl Med**, v.27, n.9, p.1410-4. 2000.

DUVOISIN, RC. Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. **Arch Neurol**, v.17, n.2, p.124-36. 1967.

FEARNLEY, JM; LEES, AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**, v.114 ( Pt 5), p.2283-301. 1991.

FERRO, MM; BELLISSIMO, MI; ANSELMO-FRANCI, JA; ANGELLUCCI, ME; CANTERAS, NS; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J Neurosci Methods**, v.148, n.1, p.78-87. 2005.

FETSKO, LA; XU, R; WANG, Y. Alterations in D1/D2 synergism may account for enhanced stereotypy and reduced climbing

in mice lacking dopamine D2L receptor. **Brain Res**, v.967, n.1-2, p.191-200. 2003.

FITZPATRICK, MO; DEWAR, D; TEASDALE, GM; GRAHAM, DI. The neuronal cytoskeleton in acute brain injury. **Br J Neurosurg**, v.12, n.4, p.313-7. 1998.

FLIERL, MA; STAHEL, PF; BEAUCHAMP, KM; MORGAN, SJ; SMITH, WR; SHOHAMI, E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. **Nat Protoc**, v.4, n.9, p.1328-37. 2009.

FUJIMOTO, ST; LONGHI, L; SAATMAN, KE; CONTE, V; STOCCHETTI, N; MCINTOSH, TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, n.4, p.365-78. 2004.

GEAN, AD; FISCHBEIN, NJ. Head trauma. **Neuroimaging Clin N Am**, v.20, n.4, p.527-56. 2010.

GERFEN, CR; KEEFE, KA; GAUDA, EB. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. **J Neurosci**, v.15, n.12, p.8167-76. 1995.

GOLDSTEIN, M. Traumatic brain injury: a silent epidemic. **Ann Neurol**, v.27, n.3, p.327. 1990.

HARDEN, DG; GRACE, AA. Activation of dopamine cell firing by repeated L-DOPA administration to dopamine-depleted rats: its potential role in mediating the therapeutic response to L-DOPA treatment. **J Neurosci**, v.15, n.9, p.6157-66. 1995.

HEDDEN, T; GABRIELI, JDE. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. **Nat Rev Neurosci**, v.5, n.2, p.87-96. 2004.

HICKS, R; SOARES, H; SMITH, D; MCINTOSH, T. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-

percussion brain injury in the rat. **Acta Neuropathol**, v.91, n.3, p.236-46. 1996.

HIRSCH, EC; PERIER, C; ORIEUX, G; FRANCOIS, C; FEGER, J; YELNIK, J; VILA, M; LEVY, R; TOLOSA, ES; MARIN, C; TRINIDAD HERRERO, M; OBESO, JA; AGID, Y. Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. **Trends Neurosci**, v.23, n.10 Suppl, p.S78-85. 2000.

HOROWITZ, MP; GREENAMYRE, JT. Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling. **Clin Pharmacol Ther**, v.88, n.4, p.467-74. 2010.

HUDSON, JL; VAN HORNE, CG; STROMBERG, I; BROCK, S; CLAYTON, J; MASSERANO, J; HOFFER, BJ; GERHARDT, GA. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Res**, v.626, n.1-2, p.167-74. 1993.

HUOT, P; LEVESQUE, M; PARENT, A. The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. **Brain**, v.130, n.Pt 1, p.222-32. 2007.

HUTSON, CB; LAZO, CR; MORTAZAVI, F; GIZA, CC; HOVDA, D; CHESSELET, MF. Traumatic brain injury in adult rats causes progressive nigrostriatal dopaminergic cell loss and enhanced vulnerability to the pesticide paraquat. **J Neurotrauma**, v.28, n.9, p.1783-801. 2010.

JOYCE, JN; SMUTZER, G; WHITTY, CJ; MYERS, A; BANNON, MJ. Differential modification of dopamine transporter and tyrosine hydroxylase mRNAs in midbrain of subjects with Parkinson's, Alzheimer's with parkinsonism, and Alzheimer's disease. **Mov Disord**, v.12, n.6, p.885-97. 1997.

KALINDERI, K; FIDANI, L; KATSAROU, Z; BOSTANTJOPOULOU, S. Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. **International Journal of Clinical Practice**, v.65, n.12, p.1289-1294. 2011.

KATZUNG, BG. Farmacologia: Básica & Clínica. **Guanabara Koogan**, n.Nona edição. 2005.

KELLEY, BJ; FARKAS, O; LIFSHITZ, J; POVLISHOCK, JT. Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultrarapid secondary axotomy and Wallerian degeneration. **Exp Neurol**, v.198, n.2, p.350-60. 2006.

KOSTRZEWA, RM. The blood-brain barrier for catecholamines - revisited. **Neurotox Res**, v.11, n.3-4, p.261-71. 2007.

LANDRIGAN, PJ; SONAWANE, B; BUTLER, RN; TRASANDE, L; CALLAN, R; DROLLER, D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. **Environ Health Perspect**, v.113, n.9, p.1230-3. 2005.

LANGLOIS, JA; RUTLAND-BROWN, W; WALD, MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. **J Head Trauma Rehabil**, v.21, n.5, p.375-8. 2006.

LEE, CS; SAUER, H; BJÄRKLUND, A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Neuroscience**, v.72, n.3, p.641-653. 1996.

LEINHASE, I; ROZANSKI, M; HARHAUSEN, D; THURMAN, JM; SCHMIDT, OI; HOSSINI, AM; TAHA, ME; RITTIRSCH, D; WARD, PA; HOLERS, VM; ERTEL, W; STAHEL, PF. Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice. **J Neuroinflammation**, v.4, p.13. 2007.

LI, S; KUROIWA, T; KATSUMATA, N; ISHIBASHI, S; SUN, LY; ENDO, S; OHNO, K. Transient versus prolonged hyperlocomotion following lateral fluid percussion injury in mongolian gerbils. **J Neurosci Res**, v.83, n.2, p.292-300. 2006.

LOANE, DJ; POCIVAVSEK, A; MOUSSA, CE; THOMPSON, R; MATSUOKA, Y; FADEN, AI; REBECK, GW; BURNS, MP.

Amyloid precursor protein secretases as therapeutic targets for traumatic brain injury. **Nat Med**, v.15, n.4, p.377-9. 2009.

LOLEKHA, P; PHANTHUMCHINDA, K; BHIDAYASIRI, R. Prevalence and risk factors of Parkinson's disease in retired Thai traditional boxers. **Mov Disord**, v.25, n.12, p.1895-901. 2010.

LUSARDI, TA. Adenosine neuromodulation and traumatic brain injury. **Curr Neuropharmacol**, v.7, n.3, p.228-37. 2009.

MARMAROU, A; LU, J; BUTCHER, I; MCHUGH, GS; MUSHKUDIANI, NA; MURRAY, GD; STEYERBERG, EW; MAAS, AI. IMPACT database of traumatic brain injury: design and description. **J Neurotrauma**, v.24, n.2, p.239-50. 2007.

MARTINS, ET; LINHARES, MN; SOUSA, DS; SCHROEDER, HK; MEINERZ, J; RIGO, LA; BERTOTTI, MM; GULLO, J; HOHL, A; DAL-PIZZOL, F; WALZ, R. Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City. **J Trauma**, v.67, n.1, p.85-90. 2009.

MASINI, M. Epidemiological study of head injuries in the Federal District of Brazil. **J Bras Neurocirurg**, v.5, p.61-68. 1994.

MCDOWELL, K; CHESSELET, MF. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**. 2012.

MEREDITH, GE; KANG, UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord**, v.21, n.10, p.1595-606. 2006.

MIKAWA, S; KINOCHI, H; KAMII, H; GOBBEL, GT; CHEN, SF; CARLSON, E; EPSTEIN, CJ; CHAN, PH. Attenuation of acute and chronic damage following traumatic brain injury in copper, zinc-superoxide dismutase transgenic mice. **J Neurosurg**, v.85, n.5, p.885-91. 1996.

MORALES, DM; MARKLUND, N; LEBOLD, D; THOMPSON, HJ; PITKANEN, A; MAXWELL, WL; LONGHI, L; LAURER, H; MAEGELE, M; NEUGEBAUER, E; GRAHAM, DI; STOCCHETTI,

N; MCINTOSH, TK. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? **Neuroscience**, v.136, n.4, p.971-89. 2005.

MORGANTI-KOSSMANN, MC; YAN, E; BYE, N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? **Injury**, v.41 Suppl 1, p.S10-3. 2010.

O'CONNOR, WT; SMYTH, A; GILCHRIST, MD. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. **Pharmacol Ther**, v.130, n.2, p.106-13. 2011.

OBESO, JA; RODRIGUEZ-OROZ, MC; JAVIER BLESÁ, F; GURIDI, J. The globus pallidus pars externa and Parkinson's disease. Ready for prime time? **Exp Neurol**, v.202, n.1, p.1-7. 2006.

OBESO, JA; RODRIGUEZ-OROZ, MC; RODRIGUEZ, M; LANCIEGO, JL; ARTIEDA, J; GONZALO, N; OLANOW, CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v.23, Supplement 1, n.0, p.S8-S19. 2000.

OBRENOVITCH, TP; URENJAK, J. Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? **J Neurotrauma**, v.14, n.10, p.677-98. 1997.

OHNO, Y; OKANO, M; IMAKI, J; TATARA, A; OKUMURA, T; SHIMIZU, S. Atypical antipsychotic properties of blonanserin, a novel dopamine D2 and 5-HT2A antagonist. **Pharmacol Biochem Behav**, v.96, n.2, p.175-80. 2010.

OLANOW, CW; STERN, MB; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). **Neurology**, v.72, n.21 Suppl 4, p.S1-136. 2009.

OLANOW, CW; WATTS, RL; KOLLER, WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines. **Neurology**, v.56, n.11 Suppl 5, p.S1-S88. 2001.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. London: Sherwood, Neely and Jones. 1817.

POPESCU, BO; TOESCU, EC; POPESCU, LIM; BAJENARU, O; MURESANU, DF; SCHULTZBERG, M; BOGDANOVIC, N. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. **Journal of the Neurological Sciences**, v.283, n.1â€“2, p.99-106. 2009.

PORTER, CC; TOTARO, JA; STONE, CA. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.140, p.308-16. 1963.

PREDIGER, R; AGUIAR, A; ROJAS-MAYORQUIN, A; FIGUEIREDO, C; MATHEUS, F; GINESTET, L; CHEVARIN, C; BEL, E; MONGEAU, R; HAMON, M; LANFUMEY, L; RAISMAN-VOZARI, R. Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, v.17, n.2, p.114-129. 2010.

PREDIGER, RD; AGUIAR, AS, JR.; MATHEUS, FC; WALZ, R; ANTOURY, L; RAISMAN-VOZARI, R; DOTY, RL. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v.21, n.1, p.90-116. 2011.

PREDIGER, RD; FERNANDES, MS; RIAL, D; WOPEREIS, S; PEREIRA, VS; BOSSE, TS; DA SILVA, CB; CARRADORE, RS; MACHADO, MS; CECHINEL-FILHO, V; COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol**, v.120, n.3, p.465-73. 2008.

RAGNARSSON, KT. Results of the NIH consensus conference on "rehabilitation of persons with traumatic brain injury". **Restor Neurol Neurosci**, v.20, n.3-4, p.103-8. 2002.



RUGBJERG, K; RITZ, B; KORBO, L; MARTINUSSEN, N; OLSEN, JH. Risk of Parkinson's disease after hospital contact for head injury: population based case-control study. **BMJ**, v.337, p.a2494. 2008.

SANBERG, PR. Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. **Nature**, v.284, n.5755, p.472-3. 1980.

SCHAPIRA, AH. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci**, v.30, n.1, p.41-7. 2009.

SCHIFFMANN, SN; FISONE, G; MORESCO, R; CUNHA, RA; FERRÃ©, S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. **Progress in Neurobiology**, v.83, n.5, p.277-292. 2007.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research**, v.318, n.1, p.215-224. 2004.

SCHWARTING, RK; HUSTON, JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Prog Neurobiol**, v.50, n.2-3, p.275-331. 1996.

SCHWARZBACH, E; BONISLAWSKI, DP; XIONG, G; COHEN, AS. Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. **Hippocampus**, v.16, n.6, p.541-50. 2006.

SCHWARZBOLD, ML; RIAL, D; DE BEM, T; MACHADO, DG; CUNHA, MP; DOS SANTOS, AA; DOS SANTOS, DB; FIGUEIREDO, CP; FARINA, M; GOLDFEDER, EM; RODRIGUES, AL; PREDIGER, RD; WALZ, R. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. **J Neurotrauma**, v.27, n.10, p.1883-93. 2010.

SETHI, K. Levodopa unresponsive symptoms in Parkinson disease. **Movement Disorders**, v.23, n.S3, p.S521-S533. 2008.

SHAPIRA, Y; SETTON, D; ARTRU, AA; SHOHAMI, E. Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic

function after closed head injury in rats. **Anesth Analg**, v.77, n.1, p.141-8. 1993.

SHIOTSUKI, H; YOSHIMI, K; SHIMO, Y; FUNAYAMA, M; TAKAMATSU, Y; IKEDA, K; TAKAHASHI, R; KITAZAWA, S; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **J Neurosci Methods**, v.189, n.2, p.180-5. 2010.

SHLOSBERG, D; BENIFLA, M; KAUFER, D; FRIEDMAN, A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**, v.6, n.7, p.393-403. 2010.

SIGNORINI, DF; ANDREWS, PJ; JONES, PA; WARDLAW, JM; MILLER, JD. Predicting survival using simple clinical variables: a case study in traumatic brain injury. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.66, n.1, p.20-5. 1999.

SIMOLA, N; MORELLI, M; CARTA, AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v.11, n.3-4, p.151-67. 2007.

SINGH, N; PILLAY, V; CHOONARA, YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v.81, n.1, p.29-44. 2007.

STAHEL, PF; SHOHAMI, E; YOUNIS, FM; KARIYA, K; OTTO, VI; LENZLINGER, PM; GROSJEAN, MB; EUGSTER, HP; TRENTZ, O; KOSSMANN, T; MORGANTI-KOSSMANN, MC. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.20, n.2, p.369-80. 2000.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, v.30, n.5, p.244-50. 2007.

SVESTKOVA, O; ANGEROVA, Y; SLADKOVA, P; BICKENBACH, JE; RAGGI, A. Functioning and disability in traumatic brain injury. **Disabil Rehabil**, v.32 Suppl 1, p.S68-77. 2010.

TEASDALE, G; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v.2, n.7872, p.81-4. 1974.

TOLOSA, E; WENNING, G; POEWE, W. The diagnosis of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v.5, n.1, p.75-86. 2006.

TOMKINS, O; FEINTUCH, A; BENIFLA, M; COHEN, A; FRIEDMAN, A; SHELEF, I. Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. **Cardiovasc Psychiatry Neurol**, v.2011, p.765923. 2011.

TYURIN, VA; TYURINA, YY; BORISENKO, GG; SOKOLOVA, TV; RITOV, VB; QUINN, PJ; ROSE, M; KOCHANNEK, P; GRAHAM, SH; KAGAN, VE. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. **J Neurochem**, v.75, n.5, p.2178-89. 2000.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**, v.5, n.1, p.107-10. 1968.

USIELLO, A; BAIK, JH; ROUGE-PONT, F; PICETTI, R; DIERICH, A; LEMEUR, M; PIAZZA, PV; BORRELLI, E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. **Nature**, v.408, n.6809, p.199-203. 2000.

UYAMA, O; OKAMURA, N; YANASE, M; NARITA, M; KAWABATA, K; SUGITA, M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.8, n.2, p.282-4. 1988.

VENDA, LL; CRAGG, SJ; BUCHMAN, VL; WADE-MARTINS, R. alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, v.33, n.12, p.559-68. 2010.

VIARO, R; MARTI, M; MORARI, M. Dual motor response to l-dopa and nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) treated mice: Paradoxical

inhibition is relieved by D(2)/D(3) receptor blockade. **Exp Neurol**, v.223, n.2, p.473-84. 2010.

VIGGIANO, D. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. **Behav Brain Res**, v.194, n.1, p.1-14. 2008.

VOS, PE; BATTISTIN, L; BIRBAMER, G; GERSTENBRAND, F; POTAPOV, A; PREVEC, T; STEPAN CH, A; TRAUBNER, P; TWIJNSTRA, A; VECSEI, L; VON WILD, K. EFNS guideline on mild traumatic brain injury: report of an EFNS task force. **Eur J Neurol**, v.9, n.3, p.207-19. 2002.

WAGNER, AK; SOKOLOSKI, JE; REN, D; CHEN, X; KHAN, AS; ZAFONTE, RD; MICHAEL, AC; DIXON, CE. Controlled cortical impact injury affects dopaminergic transmission in the rat striatum. **J Neurochem**, v.95, n.2, p.457-65. 2005.

WEIHMULLER, FB; HADJICONSTANTINO, M; BRUNO, JP. Dopamine receptors and sensorimotor behavior in MPTP-treated mice. **Behav Brain Res**, v.38, n.3, p.263-73. 1990.

WERNER, C; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Br J Anaesth**, v.99, n.1, p.4-9. 2007.

WESTERLUND, M; HOFFER, B; OLSON, L. Parkinson's disease: Exit toxins, enter genetics. **Prog Neurobiol**, v.90, n.2, p.146-56. 2010.

WILSON, MS; CHEN, X; MA, X; REN, D; WAGNER, AK; REYNOLDS, IJ; DIXON, CE. Synaptosomal dopamine uptake in rat striatum following controlled cortical impact. **J Neurosci Res**, v.80, n.1, p.85-91. 2005.

WIRDEFELDT, K; ADAMI, H-O; COLE, P; TRICHOPOULOS, D; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v.26, n.0, p.1-58. 2011.

XIE, X; RAMKUMAR, V; TOTH, LA. Adenosine and dopamine receptor interactions in striatum and caffeine-induced behavioral activation. **Comp Med**, v.57, n.6, p.538-45. 2007.

YI, JH; HAZELL, AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. **Neurochem Int**, v.48, n.5, p.394-403. 2006.

YU, F; WANG, Z; TCHANTCHOU, F; CHIU, CT; ZHANG, Y; CHUANG, DM. Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v.29, n.2, p.362-74. 2012.